



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV MATERIÁLOVÝCH VĚD A INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF MECHANICAL ENGINEERING
INSTITUTE OF MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING

KERAMICKÉ MATERIÁLY POUŽÍVANÉ V MEDICÍNĚ - VÝZVY A PŘÍLEŽITOSTI

CERAMIC MATERIALS APPLIED IN MEDICINE - CHALLENGES AND OPPORTUNITIES

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

LADISLAV VITÁSEK

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. LENKA NOVOTNÁ

BRNO 2015

Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství

Ústav materiálových věd a inženýrství

Akademický rok: 2014/15

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

student(ka): Ladislav Vitásek

který/která studuje v **bakalářském studijním programu**

obor: **Základy strojního inženýrství (2341R006)**

Ředitel ústavu Vám v souladu se zákonem č.111/1998 o vysokých školách a se Studijním a zkušebním řádem VUT v Brně určuje následující téma bakalářské práce:

Keramické materiály používané v medicíně - výzvy a příležitosti

v anglickém jazyce:

Ceramic materials applied in medicine - challenges and opportunities

Stručná charakteristika problematiky úkolu:

Rešerše má popsat současný stav a nedostatky keramických materiálů používaných v biologických aplikacích. Danou rešerši je vhodné rozdělit podle typů aplikace keramických materiálů na porézní materiály, hutné materiály a kompozity. Dle získaných informací bude následně vhodné rozvést jednu z těchto oblastí více do hloubky. Výsledky práce poslouží k identifikaci perspektivních směrů výzkumu v oblasti biokeramických materiálů na VUT v Brně.

Cíle bakalářské práce:

Popis trendů vývoje biokeramických materiálů, hledání současných nedostatků a identifikace možných budoucích směrů výzkumu.

Seznam odborné literatury:

Engineering bone: challenges and obstacles, Journal of Cellular and Molecular Medicine, Vol 9, No 1, 2005 pp. 72-84

Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, Biomaterials, Vol 26, No 27, 2005, pp 5474–5491

Vedoucí bakalářské práce: Ing. Lenka Novotná

Termín odevzdání bakalářské práce je stanoven časovým plánem akademického roku 2014/15.

V Brně, dne 2. 2. 2015



prof. Ing. Ivo Dlouhý, CSc.
ředitel ústavu

doc. Ing. Jaroslav Katolický, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce se zabývá keramickými materiály používanými v medicíně, zejména v ortopedických a dentálních aplikacích. Úvodní část práce se zaměřuje na požadavky a současný stav biomateriálů používaných v kostním tkáňovém inženýrství, jejich výhody a nevýhody. V další podkapitole jsou popsány kompozitní materiály, kde alespoň jednu složku tvoří keramický materiál. V samostatné části je popsána hutná keramika na bázi oxidu hlinitého a zhouževnatělého oxidu zirkoničitého. Hlavní část této práce je zaměřena na porézní keramické materiály na bázi kalciumfosfátů, jsou zde vymezeny požadavky na skafoldy, mezi které patří pórovitost, mechanické a biologické chování. Další část se zabývá způsoby přípravy keramických skafoldů. Experimentální část této práce byla věnována přípravě bioaktivního porézního keramického materiálu na bázi hydroxyapatitu a oxidu křemičitého se zlepšenými vlastnostmi. Replikační technikou byly vyrobeny 4 sady vzorků s obsahem oxidu křemičitého od 6 do 21 hm%. Připravené bioaktivní skafoldy se strukturou odpovídající spongiózní kosti se mohou uplatnit jako potenciální náhrady tvrdých tkání v kostním tkáňovém inženýrství.

KLÍČOVÁ SLOVA

Biomateriály, keramika, skafold, kostní tkáňové inženýrství, replikační technika

ABSTRACT

This thesis deals with ceramic materials applied in medicine, mainly in orthopaedics and dentistry. The first part is focused on requirements and current state of biomaterials in bone tissue engineering and their advantages and disadvantages. Composite materials, where ceramic material is one component at least, are mentioned in the next part. Dense ceramics based on alumina and toughened zirconia is described in the separate part. The main part of this thesis deals with porous ceramic materials based on calcium phosphates. There are also defined scaffolds requirements such as porosity, mechanical and biological properties and moreover processing methods. The experimental part of this thesis has been devoted to the preparation of bioactive porous ceramic material based on hydroxyapatite and silica with improved properties. Samples with different amount of silica in structure (6-21 wt%) were fabricated by polymer replica technique. Prepared scaffolds with structure similar to cancellous bone can be promising candidates for using in bone tissue engineering applications.

KEYWORDS

Biomaterials, ceramics, scaffold, bone tissue engineering, polymer replica technique

BIBLIOGRAFICKÁ CITACE

VITÁSEK, L. *Keramické materiály používané v medicíně - výzvy a příležitosti*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta strojního inženýrství, 2015. 48s. Vedoucí bakalářské práce Ing. Lenka Novotná.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma Keramické materiály používané v medicíně - výzvy a příležitosti vypracoval samostatně s použitím odborné literatury, uvedené v seznamu, který tvoří součást této práce.

V Brně dne 29. 5. 2015.

.....
Ladislav Vitásek

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval mé vedoucí Ing. Lence Novotné za odborný dohled a vedení v průběhu teoretické i experimentální části bakalářské práce. Zejména bych ocenil její trpělivost a užitečné rady.

Obsah

Úvod	11
I. TEORETICKÁ ČÁST	12
1 Vymezení pojmů	12
2 Biomateriály	13
2.1 Rozsah použití.....	13
2.2 Požadavky kladené na biomateriály	13
3 Rozdělení biomateriálů podle chemického složení	14
3.1 Kovy a jejich slitiny	14
3.2 Polymery	15
3.3 Keramické materiály	15
3.4 Kompozity	16
3.4.1 Keramika - kov	16
3.4.2 Keramika - polymer	17
3.4.3 Keramika - keramika	17
4 Keramika	18
4.1 Hutná keramika	18
4.1.1 Ortopedie	18
4.1.2 Dentální aplikace	21
4.1.3 Způsoby přípravy.....	21
4.2 Porézní keramika	23
4.2.1 Požadavky kladené na keramické skafoldy	23
4.2.2 Testování keramických skafoldů	23
4.2.3 Bioaktivní porézní materiály	26
4.2.4 Způsoby přípravy.....	29
II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	32
5 Příprava keramických pěn na bázi HA a SiO ₂	32
5.1 Příprava	32
5.2 Výsledky	35
Závěr.....	44
Seznam použitých zdrojů.....	45

Úvod

Snaha nahrazovat poškozené části lidského organismu vlivem opotřebení nebo jiného poškození (defekty, nemoci) je známa už od dávných dob. Jako příklad lze uvést pozůstatky člověka nalezeného u Kennewick (Washington, USA). Tento člověk žil před 9000 lety. Podle archeologů se jednalo o zdravého jedince i přesto, že měl ve svém těle přítomno cizí těleso v podobě kopí. Tento nezamýšlený implantát ilustruje schopnost lidského organismu přijmout cizí materiály [1].

Mezi nejpoužívanější biomateriály lze zařadit kovy, polymery, kompozity a v neposlední řadě keramiku. Současné použití biomateriálů v lidském těle je velmi rozsáhlé. Rozsah použití je od kloubních a zubních náhrad, včetně náhrad měkkých tkání, srdečních chlopní, cév, šlach a orbitálních implantátů až po estetickou chirurgii [2].

Omezíme-li se na použití biomateriálů pro ortopedické aplikace, jejich první neúspěšný pokus se datuje pravděpodobně do roku 1891, kdy německý chirurg Theodore Gluck použil slinutou slonovinu. Většina dále používaných implantátů do roku 1950 vykazovala nízkou pravděpodobnost přijetí lidským organismem v důsledku nedostačující sterilizace a biokompatibility [1]. První celokeramický kyčelní kloub byl implantován v roce 1970 francouzským chirurgem Pierrem Bountinem víceprezidentovi keramické společnosti. Kloubní jamka byla vyrobena z oxidu hlinitého (Al_2O_3) stejně jako kloubní hlava. Kloubní hlava byla připevněna na kovovém trnu. Prvních 200 případů se obešlo bez jakýchkoliv problémů [3].

Kromě výše zmíněné hutné keramiky, která se používá pro nosné aplikace, a ve styku s tkání se většinou chová inertně, existuje i keramika porézní. Ve styku s tkání může vykazovat jak bioinertní, tak bioaktivní chování. Současný výzkum je z velké části zaměřen na bioaktivní porézní keramické materiály, které se vyznačují dobrou biokompatibilitou. Jsou založeny převážně na hydroxyapatitu (HA), který se vyznačuje podobným složením jako minerální část lidské kosti. Bioaktivní chování mohou také vykazovat některé typy bioskel a sklokeramiky. Převážná část této práce se bude věnovat bioaktivním porézním keramickým materiálům.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 Vymezení pojmů

Pro lepší pochopení předkládané práce je vhodné si úvodem vymežit několik často problematických pojmů:

a) Biokompatibilita

Biokompatibilitou neboli tzv. biologickou snášenlivostí se rozumí vlastnost materiálu být akceptován lidským organismem. Biokompatibilní materiál podporuje běžnou buněčnou aktivitu. Současně by neměl vyvolat žádné lokální ani toxické účinky v hostitelské tkáni [4, 5].

b) Bioaktivita

Jedná se o vlastnost materiálu vyvolat specifickou biologickou odpověď na rozhraní materiálu, která vede ke vzniku vazby mezi tkání a materiálem [6].

c) Bioinertnost

Jedná se o vlastnost materiálu. Bioinertní materiál by neměl po zavedení do lidského těla vyvolat téměř žádnou reakci s okolní tkání [7].

d) Biostabilita

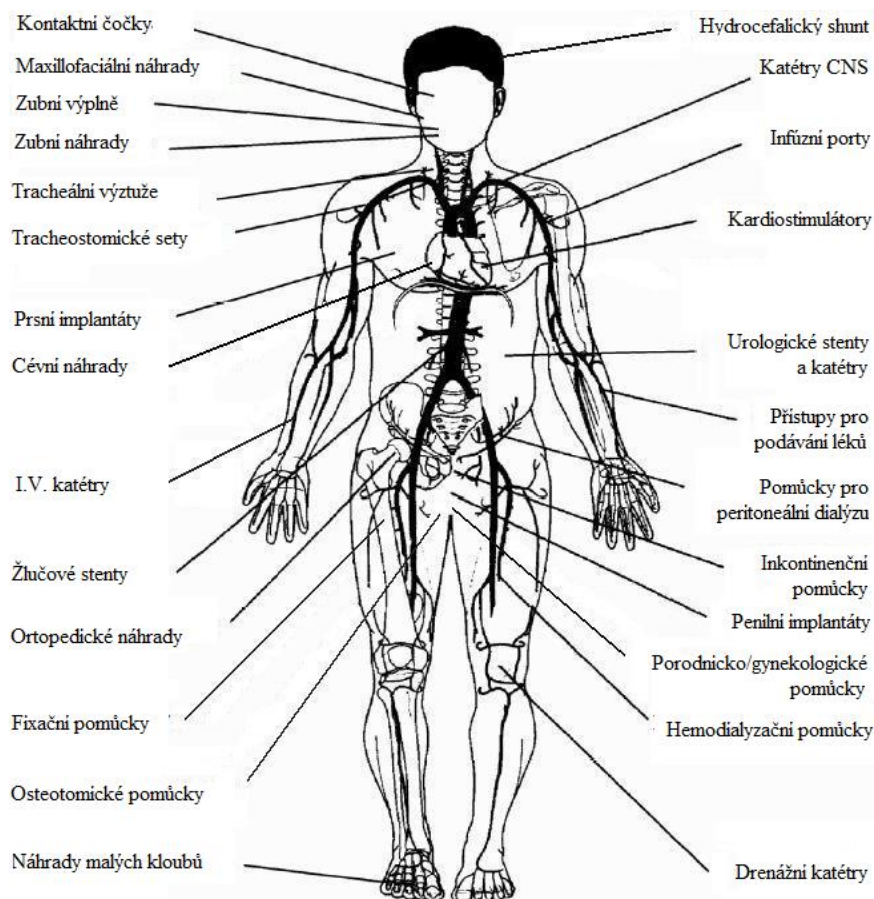
Jedná se o schopnost syntetického materiálu zachovat si původní chemické složení i po implantování do organismu. Biostabilní materiály si musí zachovat odolnost při působení tkáně, sekretů a bakterií [8].

2 Biomateriály

Biomateriál je syntetický materiál, který je používán k fyzikální náhradě tvrdé nebo měkké tkáně, která byla poškozena během patologického procesu (vlivem nemocí, úrazů) [9]. Dle odpovědi tkáně lze biomateriály rozdělit na bioinertní a bioaktivní, mezi které patří i materiály resorbovatelné [7].

2.1 Rozsah použití

Použití biomateriálů je v dnešní době velmi rozsáhlé, jak lze vyčíst z následujícího obrázku:



Obr. 1 Názorné použití biomateriálů v lidském organismu [2].

2.2 Požadavky kladené na biomateriály

Při pokusech o regeneraci tkání a orgánů v těle bylo použito velké množství biomateriálů, nicméně pouze některé z nich se ukázaly jako vhodné. Z toho důvodu je třeba i při navrhování vhodného biomateriálu v kostním tkáňovém inženýrství zohlednit řadu klíčových požadavků [10].

a) Biologické

Mezi všeobecné biologické požadavky lze zařadit zejména dobrou biokompatibilitu a osteoinduktivitu, tzn. buňky by měly na povrchu implantátu migrovat, proliferovat a vytvo-

řit vlastní kostní matrix. Neméně významnou roli hraje kostní morfogenetický protein (BMP), který vytváří vhodné prostředí pro tvorbu embrií kostních buněk v kostním tkáňovém inženýrství. Nelze opomenout ani požadavek na sterilizaci, která brání vzniku možné infekce [11, 4].

b) Fyzikální

Mezi fyzikální požadavky lze zařadit zejména vysokou odolnost vůči opotřebení (snaha minimalizovat množství úlomků) a dostatečnou pevnost při cyklickém zatěžování, která by měla být srovnatelná s pevností nahrazované kosti [9]. Lidská kost se skládá ze spongiózní kostní tkáně a kortikální kostní tkáně, které se od sebe odlišují svými mechanickými vlastnostmi. Youngův modul kortikální kosti leží v rozmezí mezi 15 - 20 GPa, pro spongiózní kosti se pohybuje mezi 0,1 – 2 GPa. Pevnost v tlaku se pohybuje mezi 100 – 200 MPa pro kortikální kosti a v rozmezí mezi 2 – 20 MPa pro spongiózní kosti. Z důvodu velkých rozdílů v mechanických vlastnostech a geometrii je obtížné navrhnout ideální kostní materiál [4].

c) Chemické

Jedním z hlavních požadavků je biokompatibilní chemické složení, které se má vyhnout nežádoucím reakcím s tkání. Mezi chemické požadavky lze také zařadit schopnost materiálu zachovat si vynikající odolnost vůči degradaci např. odolnost vůči korozi v případě kovových materiálů nebo vůči biologické degradaci v polymerech [9]. Materiály by neměly být imunogenní a toxické. Nová kost by měla být pomocí rentgenu rozlišitelná od implantátu [11].

3 Rozdělení biomateriálů podle chemického složení

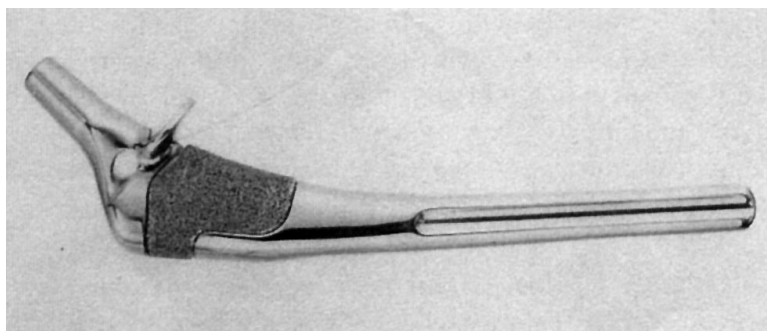
Většinu biomateriálů, které se používají v současné době na výrobu implantátů, lze rozdělit do následujících kategorií: kovy, polymery, keramické materiály a kompozity [9].

3.1 Kovy a jejich slitiny

Kovy a jejich slitiny jsou jedny z nejrozšířenějších a nejpoužívanějších materiálů pro nosné implantáty. Rozsah použití je od jednoduchých drátů a šroubů, které slouží k fixaci zlomeniny, až po totální protézy. Lze mezi ně zařadit například části kyčelních (viz Obr. 2), kolenních, ramenních, kotníkových náhrad. Kromě toho je lze používat i v obličejové a kardiiovaskulární chirurgii. Uplatnění taktéž nachází i v dentálních aplikacích na části zubních náhrad (např. kořeny, korunky) [9].

Mezi nejčastěji používané materiály v ortopedických aplikacích pro náhradu kostí se zpravidla řadí nerezová ocel, titan a slitiny titanu (tj. Ti-6Al-4V). Zlato a stříbro jsou ušlechtilé kovy, ze kterých se v dentálních aplikacích vyrábí korunky [12].

Kovy se vyznačují vysokou pevností a vynikající odolností proti únavě [4]. Nicméně je třeba počítat i s nevýhodami, zejména s nedostatečnou tkáňovou přilnavostí. Navíc v důsledku korodování může docházet k hromadění kovových iontů v těle, což zpravidla zvyšuje riziko toxicity v těle. Tento problém může vést k následným reoperacím, při kterých dochází k nahrazení současného implantátu jinou náhradou [12].



Obr. 2: Kovový trn kyčelního kloubu [1].

3.2 Polymery

Polymery patří mezi biomateriály, které nachází rozsáhlé použití v medicínských aplikacích. V kostním tkáňovém inženýrství se používají na umělé čelisti a části kyčelních nebo kolenních kloubů. Nicméně je lze použít i v jiných odvětvích medicíny například na tracheální výztuže, části jater nebo ledvin a srdeční komponenty [9].

Dají se rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní polymery tvoří stavební materiál tkání [12]. Běžně používané přírodní polymery pro kostní tkáňové inženýrství jsou kolagen, fibrin, alginát, hedvábní, kyselina hyaluronová a chitosan [4].

Přírodní polymery vykazují bioaktivní chování a tím umožňují buňce vynikající přilnavost a přirůstání k povrchu implantátu. Kromě toho jsou resorbovatelné a umožňují hostitelské buňce v průběhu času vytvoření vlastní extracelulární matrix. Na druhou stranu mají nedostatečné mechanické vlastnosti (pevnost v tlaku do 30 MPa, Youngův modul 1,3 GPa [13], což jsou hodnoty odpovídající pouze spongiózní části kosti). Z toho důvodu nelze tyto materiály používat pro nosné aplikace [10].

Z nejběžněji používaných syntetických polymerů v kostním tkáňovém inženýrství stojí za zmínku polymery na bázi kyseliny polymlečné (PLA) a glykolové (PGA), respektive jejich kopolymer PLGA. PLA je charakterizován vysokou pevností v tahu 21 – 60 MPa a Youngovým modulem 0,35 - 3,5 GPa, je biokompatibilní a biodegradabilní. PGA je také syntetický biodegradabilní polymer s vysokou pevností v tahu 60-100 MPa, Youngovým modulem 6 - 7 GPa a vysokou krystalinitou. Ve srovnání s PLA má rychlejší dobu rozkladu od 6 do 12 týdnů [14, 15]. Všestrannost chemicky syntetizovaných polymerů umožňuje zhotovení náhrad s rozdílnými vlastnostmi jako je tvar, pórovitost, velikost pórů a stupeň degradace [12].

Mezi nevýhody většiny polymerů lze zahrnout nebezpečí odmítnutí organismem kvůli snížené bioaktivitě. Další nevýhodou některých syntetických polymerů je degradace hydrolyzou, při které vzniká oxid uhličitý. Následně může docházet ke snížení lokálního pH a k odumření buněk nebo tkání [10].

3.3 Keramické materiály

Keramické materiály jsou obvykle charakterizovány velmi nízkou elasticitou a vysokou tvrdostí ve srovnání s jinými materiálovými skupinami. Kromě toho nepodléhají korozi a galvanickému spojování, jak lze pozorovat u kovů [10].

Tradičně nachází širokou škálu použití ve stomatologii. Zahrnují materiály na korunky, kořeny, cementy a umělé zuby. Mezi jejich další použití se řadí náhrady částí kyčelních a kolenních kloubů, opravy onemocnění dásní, rekonstrukce, rozšíření a stabilizace čelistní kosti, fúze páteře a kostní plniva po operaci nádorů [16]. Keramické implantáty pro osteogenezi (tvorba kostí) jsou založeny hlavně na hydroxyapatitu ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), anorganické složce

kosti [12]. Nicméně jejich použití v jiném odvětví biomedicíny není zatím tak rozsáhlé ve srovnání s polymery a kovy [9].

Nové trendy používání keramiky

Relativně novou klinickou oblastí, kde keramika nachází v současné době uplatnění, je orbitální chirurgie. Jedná se o interdisciplinární klinický obor, který zahrnuje úzkou spolupráci mezi maxilofaciální a oční chirurgií. Cílem je léčba pacientů, kteří jsou postiženi onemocněními očnice - oprava orbitálního dna/stěny, traumatické zlomeniny. Nedávné pokroky v chirurgických technikách a biomateriálových vědách umožňují úspěšně léčit i vážné případy s vynikajícími pooperačními výsledky. Implantovaný skafold (materiál, který má porézní strukturu) se chová jako kostní štěp. Zajišťuje strukturální podporu v místě kostního defektu (zlomeniny), podporuje vrůstání kosti a bezpečné ukotvení k hostitelské tkáni. Pro tyto účely jsou vhodné některé typy biokompatibilních keramických materiálů. Mezi nejvhodnější materiály na opravy dna a stěn očnice se například řadí porézní hydroxyapatit (HA), některé typy bioskel a kompozit HA/polyethylen (PE) [17].

Problematika keramických materiálů bude podrobněji rozvedena v další části bakalářské práce.

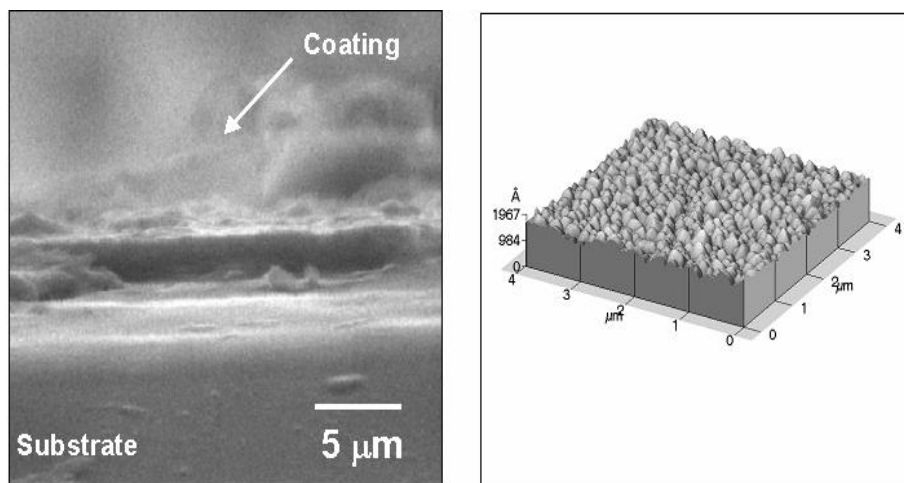
3.4 Kompozity

Kompozitní materiály se skládají ze dvou nebo více rozdílných složek nebo fází, které jsou kombinovány za účelem zlepšení fyzikálních, mechanických a biologických vlastností. Struktura je navržena za účelem plnění specifických požadavků s ohledem na jejich použití (tvrdost, tuhost). Hlavní důvod používání kompozitních materiálů spočívá v možnosti optimalizace mechanických vlastností [18].

3.4.1 Keramika - kov

Kovový materiál povlakovaný keramickým materiálem se řadí mezi často používané kompozitní materiály v kostním tkáňovém inženýrství z důvodu zlepšené fixace ortopedických protéz. Hydroxyapatit je jedním z materiálů s dobrou biokompatibilitou, který je schopen vytvořit biokeramický povlak na porézním kovovém substrátu [16, 19]. Bylo zjištěno, že slitiny na bázi titanu jsou vhodné jako substráty pro tenkovrstvé povlaky, viz Obr. 3. Tyto slitiny vykazují při zatížení dobrou mechanickou pevnost a odolnost vůči únavě [7].

Mezi používané techniky výroby povlaků se řadí například metoda žárového stříkání. Tepelně nanášené povlaky jsou neustále zdokonalovány použitím rozdílného chemického složení a dalším tepelným zpracováním, které přeměňuje amorfní fázi na krystalické kalciumfosfáty. Mezi další metody, které využívají tepelného zpracování za vysokých teplot, patří pulzní laserová depozice a rozprašování. Techniky jako je elektrodepozice nebo sol-gel využívají nižších teplot a vyhnou se tak problému strukturální nestability hydroxyapatitu při zvýšených teplotách [7].



Obr. 3 Obrázky SEM a AFM hydroxyapatitového povlaku připraveného sol – gel technikou na slitině titanu [7].

3.4.2 Keramika - polymer

Z hlediska ortopedických aplikací je velmi těžké navrhnout kompozitní materiál, který dokonale kopíruje mechanické vlastnosti a vysoce organizované struktury spongiózní a kortikální kosti. Jedny z biomateriálů, které splňují tyto požadavky, jsou kompozity založené na bázi kyseliny polymléčné a kalciumfosfátů (PLA-CaP) nebo kompozity složené z kopolymeru kyseliny polymléčné a kyseliny glykolové a kalciumfosfátů (PLGA-CaP) [14].

Hlavní výhoda těchto kompozitních materiálů spočívá v možnosti optimalizace vlastností v závislosti na aplikaci. Biologické, mechanické a strukturní chování lze ovlivnit způsobem přípravy, vlastnostmi a obsahem základních složek materiálů nebo interakcí mezi matricí a plnivem. Pokud je obsah CaP nízký, dojde ke zlepšení pevnosti v tlaku a bude zajištěna vazba mezi CaP a tkání. Přidání velkého množství CaP do polymerní matrice má za následek snížení pevnosti v tahu v důsledku křehkosti CaP. S rostoucím zastoupením CaP taktéž klesá obsah polymerní matrice, která jej obklopuje. Tím může dojít ke zhoršení integrity, která sníží pevnost v tlaku. Nicméně existuje stále řada problémů, které omezují již tak rozsáhlé použití těchto kompozitů. Mezi hlavní výzvy současných výzkumů lze zařadit snížení rizika zánětů a zkrácení dlouhodobé degradace [14].

3.4.3 Keramika - keramika

Jednotlivé keramické materiály vykazují odlišné mechanické vlastnosti a rozdílné biologické chování (bioinertní, bioaktivní). Nicméně některé aplikace vyžadují kombinaci těchto vlastností. Z toho důvodu byly navrženy keramicko - keramické kompozity [20].

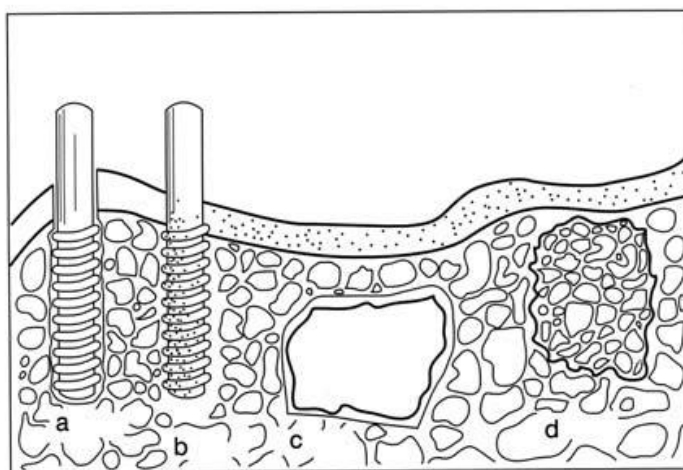
Mezi jedny z mnoha kompozitních materiálů, které nacházejí použití v medicínských aplikacích, patří kompozity na bázi ZrO_2/HA . Základní složkou tohoto kompozitu je porézní oxid zirkoničitý (ZrO_2), který je schopen přenášet zatížení díky výborným mechanickým vlastnostem. Nicméně tento oxid není schopen přímo vytvořit vazbu s kostí a ani neumožňuje vrůstání tkáně do pórů. Z toho důvodu je potahován hydroxyapatitem (HA). Vnější povlak HA zlepšuje biokompatibilitu, osteokonduktivitu (jedná se o vlastnost materiálu, která podporuje vrůstání kosti) a bioafinitu, nicméně sám o sobě vykazuje velmi špatné mechanické vlastnosti [20]. Poréznost těchto materiálů lze měnit přibližně od 70% do 95% a pevnost v tlaku roste s přibývajícím obsahem oxidu zirkoničitého [21]. Na druhou stranu je třeba při výrobě zamezit nežádoucí reakci mezi ZrO_2 a HA, která by zhoršila mechanické vlastnosti

a biokompatibilitu. Jednou z variant je přidání vrstvy inertního flouroapatitu mezi ZrO_2 a HA [20].

Tyto kompozity mohou být použity v chirurgických aplikacích z důvodu rychlé fixace a rovnoměrného vrůstání na rozhraní [20].

4 Keramika

Biokeramika je keramický materiál, který je používán pro opravy a rekonstrukce nemocných nebo poškozených částí pohybového systému. Může být bioinertní (oxid hlinitý, oxid zirkoničitý), bioaktivní (hydroxyapatit, bioaktivní sklo a sklokeramika), vstřebatelná (fosforečnan vápenatý, některá bioskla), nebo porézní, kdy tkáň prorůstá dovnitř (hydroxyapatitový povlak na kovech). Lepší názornost viz Obr. 4. V dnešní době lze připravit také biokeramiku, která je schopna vytvořit vazbu mezi tvrdou a měkkou tkání [16].



Obr. 4 Rozdělení biokeramiky podle biologického chování: (a) bioinertní zubní implantát z oxidu hlinitého, (b) bioaktivní povlak hydroxyapatitu na kovovém zubním implantátu, (c) povrchově aktivní biosklo, (d) biologicky rozložitelný implantát z fosforečnanu vápenatého ($Ca_3(PO_4)_2$) [7].

Podle použití lze biokeramické materiály rozdělit na hutné a porézní.

4.1 Hutná keramika

Její hlavní použití je v ortopedii, kde se používá zejména k náhradě částí kyčelních a kolenních kloubů. Dále ji lze použít v zubním lékařství. Keramika tvořená oxidem hlinitým nebo oxidem zirkoničitým je nejčastěji považována za bioinertní, i když ji nikdy nelze uvažovat jako naprosto inertní, dochází k zapouzdření implantátu okolní tkání [22].

4.1.1 Ortopedie

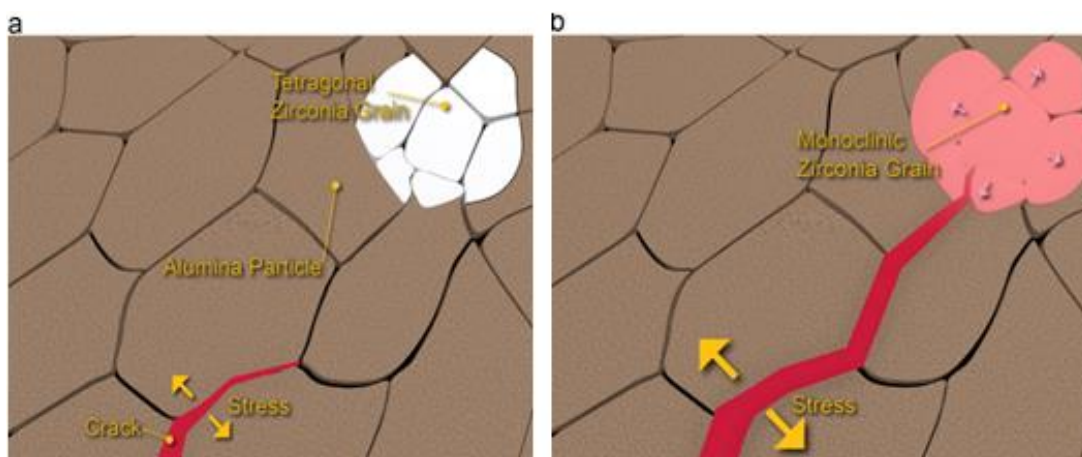
Oxid hlinitý a oxid zirkoničitý se používají od roku 1960 pro řadu ortopedických aplikací. Ve styku s kostí se chovají inertně. Jejich vysoká pevnost a nízký součinitel tření způsobuje malou míru opotřebení na stykových površích [7].

a) Oxid hlinitý - Al_2O_3

První klinicky použitý biokeramický materiál byl oxid hlinitý ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), který se vyznačoval vysokou hustotou a čistotou ($> 99,5\%$). Dodnes se z něj vyrábí nosné kyčelní protézy z důvodu výborné odolnosti vůči korozi, dobré biokompatibilitě, vysoké odolnosti vůči opotřebení a vysoké pevnosti. Většina implantátů je vyrobena z polykrystalického $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, nicméně existují i některé implantáty vyrobené z monokrystalického safíru. Během slinování se používá velmi malé množství oxidu hořečnatého, aby se omezil růst zrna [16]. Oxid hořečnatý ve struktuře zvyšuje hustotu při nižší teplotě, což vede k vyšší pevnosti [23].

Pevnost, odolnost proti únavě a lomová houževnatost polykrystalických $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ závisí na velikosti zrna. Velikost zrna souvisí s dopujícími prvky a teplotou slinování. Oxid hlinitý se střední velikostí zrna $< 4 \mu\text{m}$ a $> 99,7\%$ čistoty vykazuje pevnost v ohybu od 400 do 550 MPa a vynikající pevnost v tlaku okolo 4500 MPa. Dále se vyznačuje vynikajícími tribologickými vlastnostmi (tření a opotřebení), ale současně musí být zrna menší než $4 \mu\text{m}$ a musí mít relativně stejné rozměry. Tyto podmínky vedou k velmi nízké drsnosti povrchu ($R_a \leq 0,02 \mu\text{m}$). Přítomnost velkých zrn ve struktuře je nežádoucí. Tato zrna se mohou vydrolit a vést k rapidnímu opotřebení na nosných kloubech z důvodu suchého tření a abraze [16].

Oxid hlinitý zhouževnatěný oxidem zirkoničitým (ZTA) je materiál, který kombinuje výhodné vlastnosti oxidu zirkoničitého a oxidu hlinitého. Majoritní fázi tvoří oxid hlinitý (70-95 %) a minoritní fázi tvoří oxid zirkoničitý (30-5 %). Přidání tetragonálního oxidu zirkoničitého do oxidu hlinitého vede k vyšší lomové houževnatosti a malému poklesu tvrdosti a modulu pružnosti. Vyšší lomová houževnatost umožňuje výrobu tenkých částí implantátů, které redukuje dislokace a zároveň vedou ke zlepšení stability implantátu. ZTA mají často lepší mechanické vlastnosti než samotný oxid hlinitý nebo stabilizovaný oxid zirkoničitý. Těchto vlastností lze dosáhnout například řízenou fázovou transformací oxidu zirkoničitého (zhouževnatěním, je popsáno v následující podkapitole), při které dochází ke změně tvaru zrn. Tato zrna následně blokují růst trhlin, viz Obr. 5 [24].



Obr. 5 Ukázka šíření trhliny v ZTA a její zastavení díky fázové transformaci ZrO_2 [24].

b) Oxid zirkoničitý - ZrO_2

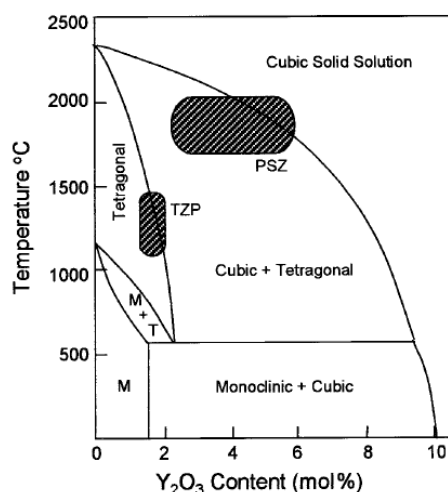
Keramické náhrady vyrobené z oxidu zirkoničitého mají několik výhod oproti jiným keramickým materiálům. Důvodem jsou lepší mechanické vlastnosti získané zhouževnatěním stabilizovaného ZrO_2 fázovou transformací. Transformace je martenzitického typu, bezdifúzní, sřihová [25].

Oxid zirkoničitý se vyskytuje ve třech krystalických fázích, viz Obr. 6: monoklinické (M), kubické (C), tetragonální (T). Čistý oxid zirkoničitý má při pokojové teplotě monoklinickou krystalickou mřížku. Tato fáze je stabilní až do 1170 °C. Při vyšších teplotách nastává transformace na tetragonální fázi. Při teplotě 2370 °C přechází tetragonální fáze na fázi kubickou. Poté následuje chlazení. Fázová transformace T-M probíhá při chlazení při teplotě 970 °C. Současně dochází ke zvyšování objemu o 3-4 % a smykového napětí o 7 %. Vyvolané změny objemu a napětí v čistém oxidu zirkoničitém mají za následek vznik trhlin, což omezuje jeho použití na implantáty z důvodu nestability při fázové transformaci. Jednou možností je stabilizace ZrO_2 pomocí některých oxidů [25, 24].

ZrO_2 stabilizován 2-3 mol% Y_2O_3 je za pokojové teploty tvořen tetragonálními zrny o velikosti řádu stovek nanometrů. Množství zachované T- fáze za pokojové teploty závisí na velikosti zrn a na obsahu oxidu yttritího [25]. U stabilizovaného ZrO_2 vyvolané změny objemu a napětí v důsledku fázové transformace brání šíření trhlin, čímž dochází ke zlepšení lomové houževnatosti. Kromě blokování růstu trhlin, dochází v důsledku změny objemu i ke vzniku mikrotrhlin. Mikrotrhliny efektivně rozdělí napětí před hlavní trhlinou, a tudíž také zvyšují lomovou houževnatost. Nicméně příliš velké množství mikrotrhlin vede ke snížení pevnosti [24].

V roce 1929 Ruff a kolektiv ukázali realizovatelnost stabilizace C-fáze při pokojové teplotě přidáním malého množství CaO do oxidu zirkoničitého. Přidání stabilizačních oxidů na bázi CaO, MgO, CeO₂, Y₂O₃ do čistého oxidu zirkoničitého umožňuje tvorbu vícefázových materiálů známých jako PSZ (částečně stabilizovaný oxid zirkoničitý). Majoritní část mikrostruktury se při pokojové teplotě skládá z kubického oxidu zirkoničitého, minoritní část tvoří precipitáty monoklinického a tetragonálního oxidu zirkoničitého. Precipitáty se vylučují na hranicích nebo uvnitř zrn kubické matrice [25].

Fázová transformace na povrchu implantátu, známá jako nízkoteplotní degradace nebo stárnutí, má nežádoucí dopad na životnost a výkonnost implantátů. Monoklinický ZrO_2 vykazuje na povrchu nižší tvrdost, odolnost proti vzniku trhlin a opotřebení ve srovnání s tetragonální fází z důvodu větší velikosti zrn. Větší velikost zrn taktéž vede k jejich snadnějšímu vydrolování z povrchu implantátu [24].



Obr. 6 ZrO_2 - Y_2O_3 fázový diagram. Šedé oblasti označují běžně používané keramiky v kostním inženýrství [26].

4.1.2 Dentální aplikace

V dnešní době se keramické biomateriály používané v dentálních aplikacích stávají stále zajímavějšími. Důvodem je rostoucí poptávka po celokeramických zubních náhradách včetně kořenových implantátů, viz Obr. 7. Dentální aplikace kladou na keramické materiály další specifické požadavky. Zejména je kladen důraz na estetiku, tj. schopnost měnit barvu a průsvitnost, což u porcelánu nebylo možné. Právě změna barvy od bílé až po slonovinovou se řadí mezi hlavní důvody současného vývojového směru těchto náhrad [7].

Mezi současně používané materiály v dentálních aplikacích se řadí leucitové sklokeramiky, které se vyznačují vysokou průhledností. Vyrábí se z nich výplně (inleje, onleje) a korunky [27]. Taktéž se používají vlákna bioskel nebo titanu kombinovaná s keramickou nebo skleněnou matricí. Z důvodu dostatečné pevnosti a velmi dobré biokompatibility může být i biosklo v kombinaci s kovovou výztuží použito jako dentální implantát. Stejně tak kompozity z titanových slitin a keramiky tvořené oxidem hlinitým jsou také navrhovány pro dentální účely. Většina moderních aplikací kompozitních materiálů jsou zubní plniva, která stále více nahrazují materiály na bázi amalgámu [18].

Nedávné zavedení keramiky na bázi oxidu zirkoničitého určeného k výrobě celokeramických dentálních náhrad vyvolalo značný zájem ve stomatologii. Díky výborným mechanickým vlastnostem tohoto materiálu, pevnost v ohybu 1200 MPa [16], lze realizovat částečně fixované zadní zubní náhrady a podstatné snížení tloušťky jádra. Existuje mnoho typů keramických materiálů z oxidu zirkoničitého, nicméně pro použití ve stomatologii jsou zatím vhodné pouze některé. Jedná se o tetragonální polykrystalický oxid zirkoničitý stabilizovaný oxidem yttriovým (3Y-TZP), oxid zirkoničitý částečně stabilizovaný oxidem hořečnatým (Mg-PSZ) a oxid hlinitý zhouževnatěný oxidem zirkoničitým (ZTA) [28].



Obr. 7 Celokeramická zubní náhrada [29].

4.1.3 Způsoby přípravy

Základním postupem výroby hutných keramických implantátů je příprava keramického prášku, jeho tvarování do požadovaných tvarů, rozměrů a následné slinování v pecích za vysokých teplot.

a) Výroba ortopedických implantátů

V současné době se k výrobě ortopedických implantátů nejčastěji používá izostatické lisování za studena/tepla a injekční vstřikování, nicméně existují i jiné způsoby přípravy.

Izostatické lisování za studena/tepla (CIP/HIP)

Prvním krokem této metody je uzavření keramického prášku do elastické formy, která se následně ponoří do kapaliny a prostřednictvím čerpadla dojde k vyvolání vysokého tlaku. Vzniklým tlakem je prášek izostaticky lisován za studena. Lisováním se dosáhne rovnoměrné hustoty a tvaru. Z důvodu jednodušší manipulace prochází neslinuté těleso („green body“) předspékáním, kde se zahřeje na teplotu nižší než je teplota slinování. Následuje slinutí, při kterém se zvyšuje průměrná velikost zrna. Současně se uzavírají póry a tím pádem klesá porozita, naopak roste hustota. Tento krok může být pro některé implantáty konečným. Implantáty, u kterých není po slinutí dosaženo požadovaných vlastností, jsou izostaticky lisovány za tepla. Používá se plyn o vysoké teplotě (vyšší než teplota rekrystalizace materiálu) a tlaku. Dokončovací operace se provádí prostřednictvím laserového leptání. V tomto procesu se odstraňují povrchové nerovnosti, které by mohly působit jako koncentrátoři napětí. Po laserovém leptání jde výrobek do závěrečné fáze procesu, ve kterém je vybroušen a vyleštěn [30].

Injekční vstřikování

Prvním krokem je příprava keramické suspenze, která se snadněji zpracovává do forem při následném vstřikovacím procesu. Suspenze se připraví smícháním keramického prášku a pojiva za vzniku homogenní směsi. Mezi základní funkce pojiv lze zařadit schopnost udržet původní tvar neslinutého tělesa až do zahájení procesu slinování. Hlavními parametry ovlivňujícími bezdefektnost a vysokou hustotu neslinutého tělesa je správný vstřikovací tlak a teplota. S rostoucí hustotou rostou i materiálové vlastnosti. Optimální tlak umožňuje dokonale vyplnit celou dutinu formy. Konečnou fází je slinování [31].

b) Výroba dentálních implantátů

Polotovary dentálních náhrad lze například připravit metodou suspenzního lití. Ze současných metod opracování keramických implantátů stojí za zmínku CAD (modelování pomocí počítače, viz Obr. 8) a CAM (obrábění pomocí počítače).

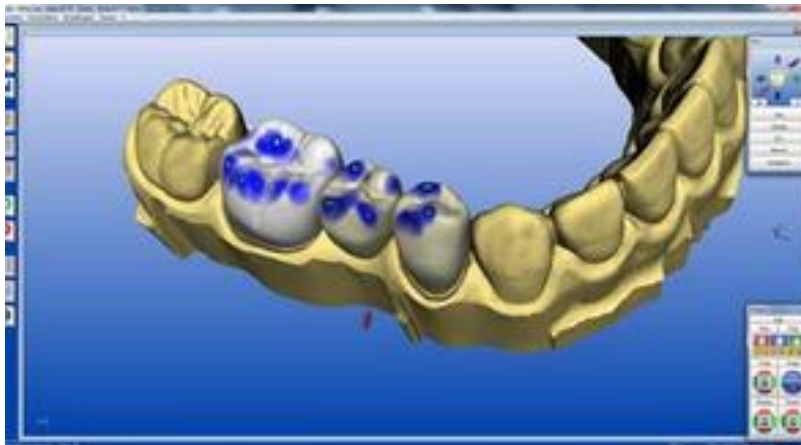
Suspenzní lití

Tato metoda je schopna vytvořit komplexní polotovary náhrad s dobrou homogenitou materiálu. Může vycházet například z keramické suspenze na bázi vody, která se nalije do porézní formy. Porézní forma díky kapilárním silám odstraní vodu ze suspenze. Následně se forma odstraní a výrobní proces pokračuje vysušováním a slinováním. Tato technika je vcelku jednoduchá a relativně levná. Touto metodou mohou být získány náhrady, které vykazují hustotu až 98,5 % [32].

CAD/ CAM modelování a obrábění

Tato technologie byla během posledních dvou desetiletí použita k nahrazení pracné a časově náročné voskové metody. Umožňuje vyrábět složité tvary keramických protéz v rámci počítačově řízené výroby. Existují dva hlavní způsoby. Jeden pro lehce obrobitelné

biokeramiky, kde počítačově řízený frézovací proces je používán k přímému obrábění keramických polotovarů, získaných například metodou suspenzního lití. Druhý systém je navržen pro obtížně obrobitelné materiály. Kvůli problému obrobitelnosti po úplném slinutí je frézovací proces proveden už u předspékaných polotovarů. Při obrábění je tedy nutné ponechat přídavek, který kompenzuje smrštění obrobeného implantátu v průběhu doslinutí [33].



Obr. 8 Ukázka CAD modelování [34].

4.2 Porézní keramika

Mezi jedny z klíčových výzev kostního tkáňového inženýrství současné doby se řadí návrh a příprava bioaktivních porézních keramických skafoldů, které se vyznačují ideálním chemickým složením, propojenými póry a dobrými biologickými a mechanickými vlastnostmi [4].

4.2.1 Požadavky kladené na keramické skafoldy

Na skafoldy v kostním tkáňovém inženýrství je kladen nespočet požadavků. V první řadě by měly být biokompatibilní. Dále by měly být osteoinduktivní a osteokonduktivní, resorbovatelné (míra vstřebatelnosti by měla být rovna míře rychlosti tvorby kosti), snadno vyrobitelné a sterilizovatelné. V poslední řadě by měla být zajištěna snadná manipulace na operačním sále nejlépe bez přídavných procesů, aby se snížilo riziko možné infekce [11].

Struktura skafoldu musí být trojrozměrná a umožnit buňce interakci tím, že poskytuje cestu pro přepravu živin a kyslíku a díky tomu je umožněn rozvoj tkání a kapilár. Póry ve skafoldu musí být zcela propojené a struktura musí být schopna podporovat konstrukční zatížení, která jsou běžná v lidském organismu. Skafold je možné modifikovat tak, aby obsahoval nezbytnou pórovitost k dosažení požadované biologické a mechanické odpovědi [35].

4.2.2 Testování keramických skafoldů

U porézního keramického skafoldu se zpravidla hodnotí porozita, velikost pórů, mechanické a biologické vlastnosti.

a) Porozita a velikost pórů

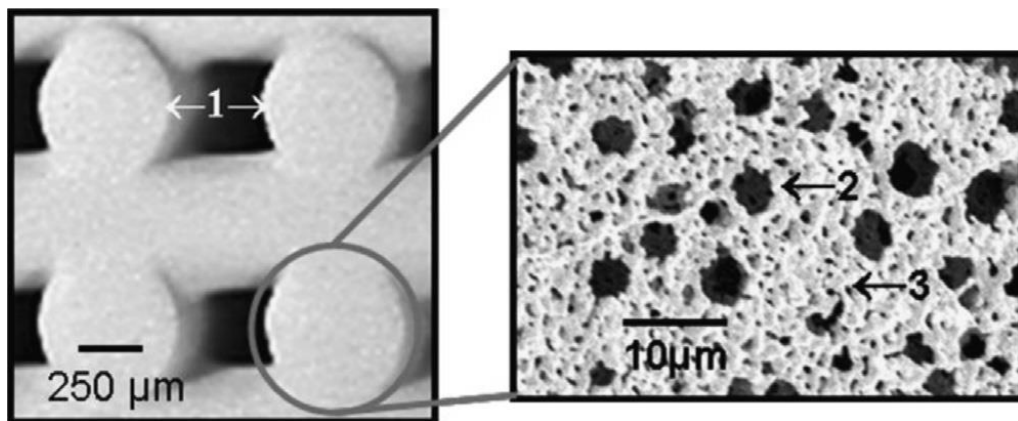
Celková porozita (P_c) je definována jako procentuální podíl prázdného prostoru v celém prostoru, lze ji určit z následujícího vztahu:

$$P_c = \left(1 - \frac{\rho_{obj.}}{\rho_{teor.}}\right) * 100 \quad (1)$$

kde $\rho_{obj.}$ je objemová hmotnost (zdánlivá hustota) skafoldu a $\rho_{teor.}$ je teoretická hustota plně slinutého keramického materiálu [12].

Porozita je morfologická vlastnost nezávislá na materiálu. Póry umožňují migraci a proliferaci osteoblastů (buňka, která vytváří kostní matrix) a mezenchymálních buněk stejně jako vaskularizaci. Kromě toho porézní povrch zlepšuje mechanické propojení mezi implantovaným biomateriálem a kostí. Dále je známo, že rostoucí pórovitost zvyšuje složitost reprodukovatelné výroby skafoldu [4].

Póry mohou být ve formě formě mikropórů (< 5 μm v důsledku neúplného slinování) nebo ve formě makropórů (> 100 μm), viz Obr. 9. Pro přežití buněk by póry měly mít v průměru nejméně 100 μm . Nicméně bylo dokázáno, že velikost pórů v rozmezí 200 - 350 μm (až 400 μm) je optimální pro vrůstání kostní tkáně [4]. Menší póry o velikosti 75 - 100 μm umožňují vrůstání nemineralizované osteoidní tkáně. Póry v rozmezí 10 - 75 μm jsou vhodné pro vrůstání vazivové tkáně [36, 35].



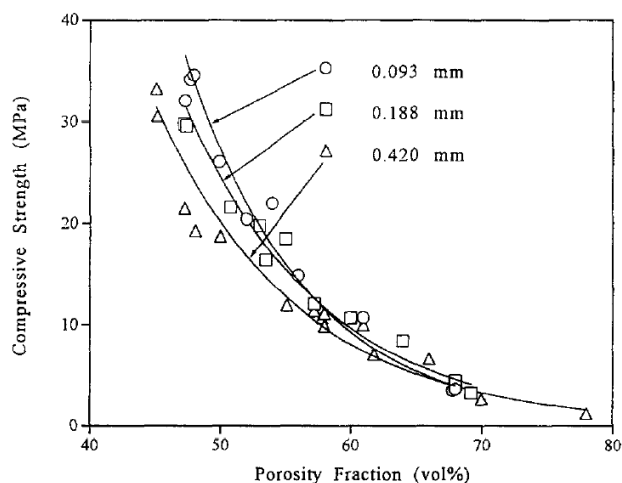
Obr. 9 Ukázka rozdílné velikosti pórů v jednom skafoldu, 1) makropóry, 2) a 3) mikropóry [35].

b) Mechanické vlastnosti

Mezi nejčastěji vyhodnocované mechanické vlastnosti porézní keramiky patří pevnost v tlaku. Pevnost v tlaku klesá s rostoucí pórovitostí. Existuje mnoho vztahů popisujících vliv pórovitosti na pevnost v tlaku a mezi nejjednodušší lze zařadit Riceův exponenciální vztah:

$$\sigma = \sigma_0 e^{(-bp)} \quad (2)$$

kde σ_0 je pevnost při nulové porozitě, σ je výsledná pevnost, p objemový podíl pórů, b konstanta charakterizující póry. Vliv velikosti pórů na pevnost v tlaku je patrný z následujícího obrázku [37].



Obr. 10 Vliv velikosti pórů a celkové porozity na pevnost v tlaku [37].

Z uvedeného grafu je zřejmé, že s rostoucí velikostí pórů klesá pevnost v tlaku při pevně dané konstantní porozitě (např. pro celkovou porozitu 50% a velikost pórů 0,093 mm je pevnost v tlaku 27 MPa, zatímco pro velikost pórů 0,420 mm je jen 19 MPa). Vliv velikosti pórů je patrný zejména při nižší porozitě.

c) Biologické vlastnosti

Biologické vlastnosti se testují pomocí *in vitro* nebo *in vivo* testů. Teprve po těchto testech mohou být materiály použity na výrobu implantátů.

in vivo - testování vzorků v živém organismu, existují dvě formy výzkumu, buď testy na zvířatech, nebo klinické testy. Testování *in vivo* ukazuje lepší celkový dopad než *in vitro*. Nedochází k zanedbání žádných faktorů, avšak z hlediska bezpečnosti jedince je používáno až v konečné fázi výzkumu [38].

in vitro - testování mimo živý organismus, ve skle, v uměle připravených roztocích. V těchto roztocích lze testovat i reakci lidských buněk na nově připravený materiál. Tato metoda je ve srovnání s *in vivo* testy velmi zjednodušená, neboť neuvažuje všechny faktory působící v lidském těle (např. hormony, enzymy, apod.) [38].

Testování bioaktivity v simulované tělní tekutině (SBF)

Jedná se o simulační prostředí, kde složení simulované tělní tekutiny při teplotě 37 °C a pH = 7,4 vykazuje téměř identickou koncentraci iontů jako krevní plazma. Je všeobecně známo, že nezbytným požadavkem kladeným na bioaktivní materiál je schopnost vytvořit vazbu s kostí. Toho je dosaženo, když dojde ke vzniku apatitové vrstvy na povrchu bioaktivního materiálu. Většina současných biokeramických výzkumů využívá této *in vitro* metody ke zjišťování bioaktivity nově připravovaných materiálů [7, 39].

SBF je metastabilní roztok, který v přítomnosti apatitové nukleační funkční skupiny na substrátu vyvolá spontánní nukleaci apatitové vrstvy na povrchu materiálu. Uvádí se, že rychlost nukleace může být zvýšena například přítomností vyššího množství iontů Ca^{2+} [7].

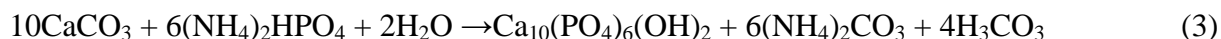
Testování resorbovatelnosti (rozpuštěnost v Tris – HCl)

Resorbovatelnost patří mezi klíčové faktory kostního tkáňového inženýrství. Ideální skafold by neměl mít pouze podobné mechanické vlastnosti jako má hostitelská tkáň, ale měl by být schopen také degradovat s časem *in vivo* [4].

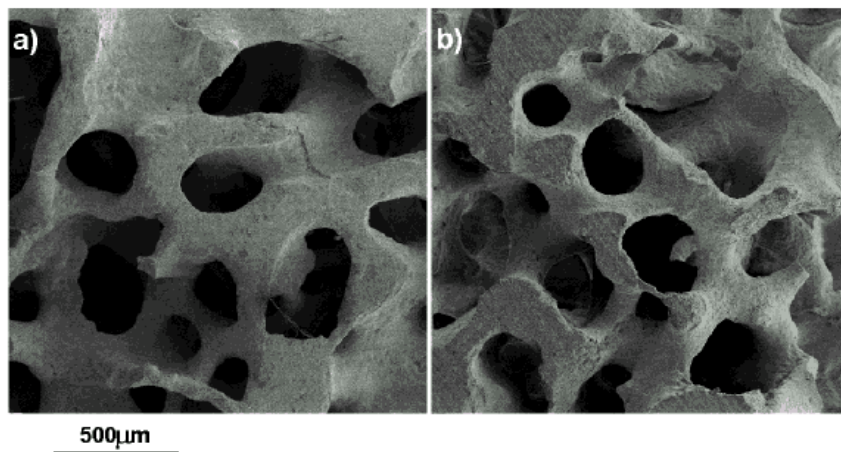
Tris - HCl (trishydroxymethylaminomethan - kyselina chlorovodíková) je jedno z prostředí, ve kterém se testuje rozpustnost materiálů *in vitro*. Princip spočívá ve vážení úbytku hmotnosti daného vzorku, který je rozpouštěn v Tris - HCl. Roztok se připravuje rozpuštěním Tris analytické kvality v deionizované vodě a poté je upraveno pH na 7,4 při teplotě 37 °C pomocí HCl. Vzorky se ponechají v tomto roztoku po určitou dobu, zpravidla 1, 3, 7, 14 a 21 dní, poté se vytáhnou, opláchnou v deionizované vodě, vysuší se ve vakuu a váží se úbytek hmotnosti. Dále se analyzuje přítomnost vápenatých a fosfátových iontů v degradačním médiu. S rostoucím časem vzorků v médiu roste jejich koncentrace. Kromě této metody se rozpustnost může též testovat v PBS (fosfátový pufr) [39, 40].

4.2.3 Bioaktivní porézní materiály

Názornou ukázkou bioaktivních porézních materiálů je krystalický korálový apatit, který vychází z mořských korálů. Korál se skládá z uhličitanu vápenatého ve formě aragonitu, což je přirozeně vyskytující se struktura, která vykazuje optimální pevnost. Struktura pórů u korálů je podobná lidské spongiózní kosti. Korál a hydrotermálně přeměněný aragonit se používají na kostní štěpy a orbitální implantáty od roku 1980. Hydrotermální metoda spočívá v přeměně aragonitu na krystalický hydroxyapatit, který si zachová porézní strukturu, viz Obr. 11. Přeměnu popisuje následující rovnice:



Porézní povaha konstrukce umožňuje vrůstání krevních cév do implantátu. Cévy jsou důležité pro dodávku krve kosti [7].



Obr. 11 Srovnání australského korálu: a) v původním stavu, b) po hydrotermální přeměně [7].

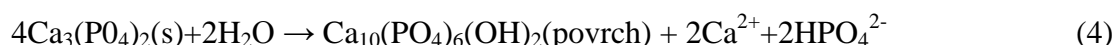
a) Kalciumfosfáty

Mezi nejčastější kalciumfosfáty, které nachází uplatnění v klinických aplikacích, patří hydroxyapatit s poměrem Ca/P = 1,67 a β -TCP (β -tricalciumfosfát) s poměrným zastoupením Ca/P = 1,5. Tyto materiály se vyznačují vynikající biokompatibilitou a bioaktivním chováním vzhledem k jejich úzké chemické a krystalické podobnosti s minerální částí kosti. Jsou osteoinduktivní, osteokonduktivní, resorbovatelné a mohou se za určitých podmínek přímo vázat

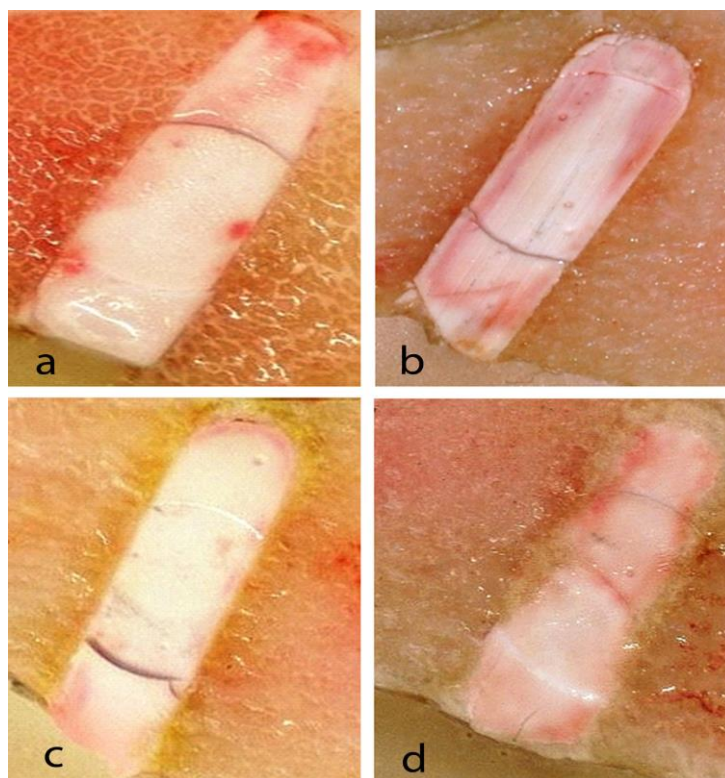
s kostí. Podporují fixaci, diferenciaci a proliferaci osteoblastů a mezenchymálních buněk. Jejich nejslabší stránkou je nízká mechanická pevnost, která omezuje použití v nosných aplikacích [41, 42].

Rychlost rozpouštění syntetického HA závisí na pH roztoku, stupni nasycení roztoku, složení a krystalické fázi HA. Krystalický HA vykazuje nejpomalejší rychlost degradace ve srovnání s jinými kalciumfosfáty. Rychlost degradace se snižuje v následujícím pořadí: Amorfni HA >> α -TCP >> β -TCP >> krystalický HA [41].

TCP se vyskytuje ve dvou fázích - α , β . Tyto fáze mají stejné chemické složení, ale odlišné krystalové struktury. Obě fáze jsou chemicky méně stabilní než HA a tudíž jsou rychleji rozpustné ve vodných prostředích [42]. Reakci TCP s vodou nebo tělní tekutinou při teplotě 37°C na HA, který se vytvoří na povrchu, popisuje následující rovnice:



Tato reakce snižuje lokální pH roztoku a dále zvyšuje rozpustnost TCP. Po implantaci bude TCP degradovat s časem *in vivo* a bude nahrazen vlastní kostní tkání, viz Obr. 11. Tento proces vede k regeneraci tkání a zároveň řeší problém mezifázové stability [42, 43].

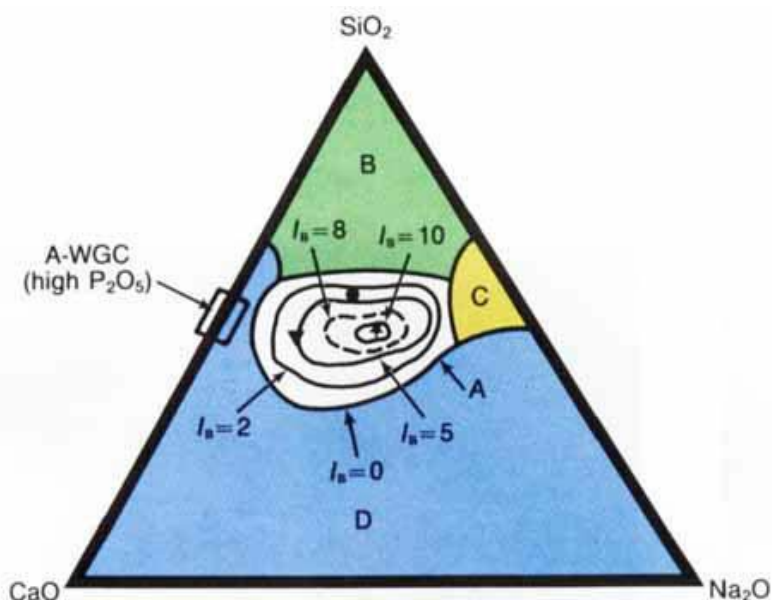


Obr. 12 Interakce tkáně s resorbovatelným TCP: a) stav ihned po implantaci, kdy je vidět ostré rozhraní mezi implantátem a tkání, b) po 6 týdnech jsou vidět pouze nepatrné změny na rozhraní, c) po 12 týdnech lze pozorovat smíšené rozhraní, d) po 24 týdnech lze pozorovat výraznou resorpci implantátu [44].

Obecně platí, že mechanické vlastnosti, zejména pevnost v tahu, tlaku a odolnost proti únavě klesají s rostoucí amorfni fází, mikropórovitostí a velikostí zrna. Vysoká krystalinita, nízká pórovitost a malé velikosti zrna vykazují vyšší tuhost, pevnost v tlaku a tahu a vyšší lomovou houževnatost [41,16].

b) Bioaktivní sklo a sklokeramika

Určité složení skla, keramiky, sklokeramiky a kompozitů je schopno vytvořit vazbu s kostí. Vazba s kostí byla prvně prokázána pro určité kompoziční složení bioaktivních skel, které obsahují 45 hm% SiO_2 , 24,5 hm% Na_2O , 24,5 hm% CaO a 6 hm% P_2O_5 , viz Obr. 13. Toto chemické složení tvoří povrch vysoce reaktivním, pokud je vystaven vhodnému prostředí [16].



Obr. 13 Vliv chemického složení materiálu na vazbu s tkání. Všechna skla obsahují 6 hm% P_2O_5 . Složení uprostřed-bioaktivní sklo (oblast A) tvoří vazbu s kostí. Měkké tkáně mohou přilnout pouze v části oblasti A, která je ohraničena přerušovanou čarou. Materiály v oblasti B se chovají jako téměř inertní materiály. Skla v oblasti C jsou vstřebatelná a zmizí v rozmezí 10 až 30 dnů po implantaci. Materiály v oblasti D nemají využití jako implantáty [16].

Společnými znaky bioaktivního skla a keramiky jsou závislost v čase a kinetická modifikace povrchu, ke které dojde po implantaci. Povrchové vrstvy biologicky aktivního hydroxyuhličitanového apatitu (HCA) poskytují vazbu mezi rozhraním a tkání. HCA fáze, která se tvoří na bioaktivním implantátu, je chemicky a strukturálně ekvivalentní s minerální fází kosti. Tato ekvivalence je zodpovědná za mezifázové vazby [16].

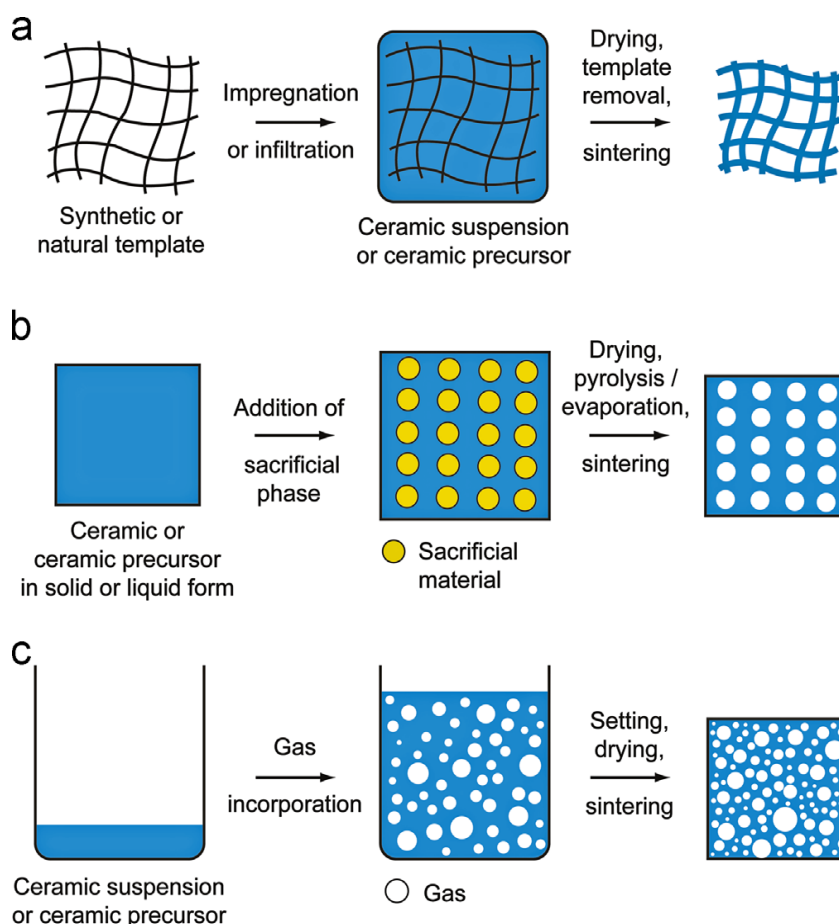
V dnešní době se bioaktivní skla používají jako plniva, povlaky polymerních struktur nebo jako samotné porézní materiály. Implantáty z bioskla se používají např. k nahrazení poškozené kostní části středního ucha, respektive k obnovení sluchu u pacientů [41].

Sklokeramika

Bioaktivní sklokeramické implantáty vykazují lepší mechanické vlastnosti než amorfní sklo nebo fosfátová keramika. Vysoká pevnost apatit-wollastonitové (A/W) sklokeramiky je způsobena vylučováním precipitátů wollastonitu a apatitu. Tato precipitační mikrostruktura přispívá k vyšší lomové houževnatosti [41].

4.2.4 Způsoby přípravy

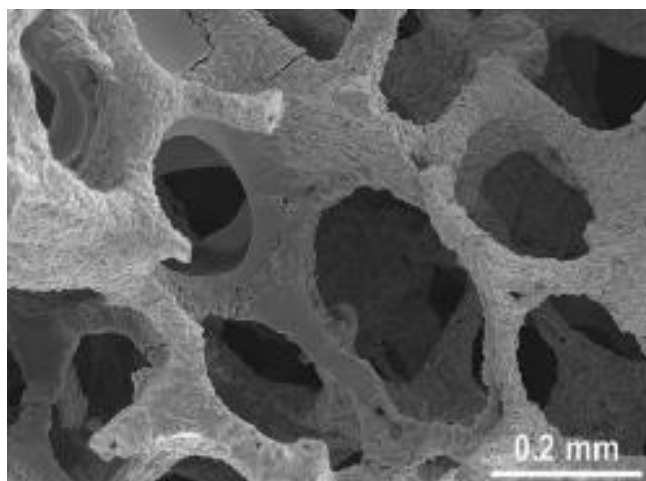
Póry mohou být začleněny do struktury keramiky přes mnoho výrobních technik. Jednou z technik je prosté slinování hrubého prášku nebo částečné slinování „greenbody” za účelem zabránění plnému ztuhnutí. Další tradiční metody výroby porézní keramiky mohou být rozděleny do tří základních skupin: technika repliky, obětní šablony a přímé pění, viz Obr. 14 [35].



Obr. 14 Metody přípravy makroporézní keramiky: a) replikační technika (kde je syntetická či přírodní šablona impregnována keramickou suspenzí, následuje vysušení, vypalování původní šablony a finální fází je slinování), b) technika obětní šablony (kde do keramické suspenze se přidá obětní šablona/materiál, následuje vysušení, odpařování obětní šablony a slinování) c) technika přímého pění (kde keramická suspenze je pěnína plynem, což má za následek vznik bublin v suspenzi, následuje vysušení a slinování) [35].

a) Replikační technika

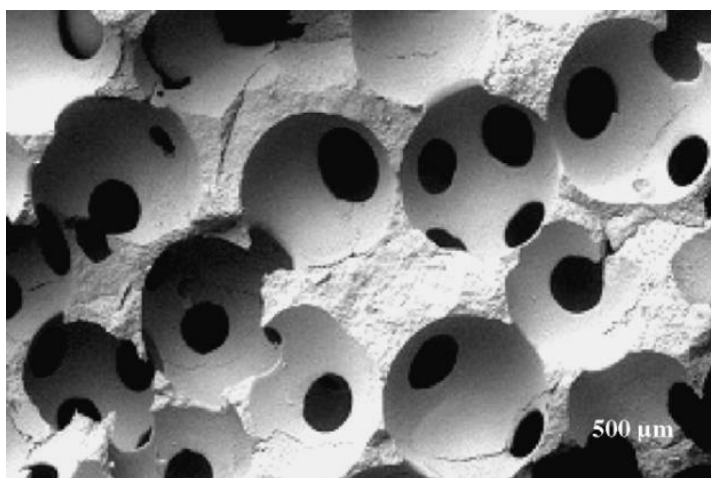
Pomocí této techniky lze připravit makroporézní keramické implantáty s velkými póry, kanálky a vysokou porozitou. Vychází z šablony, kterou obvykle tvoří polymerní nebo přírodní porézní pěna. Šablony by měly být flexibilní a schopny zachovat původní tvar i po nanesení suspenze. Nejčastěji se používá syntetická polymerní polyuretanová pěna. Suspenze by měla být rovnoměrně nanášena na stěny pěny, proto je zřejmé, že vhodná viskozita je rozdílná pro každou velikost pórů. Naimpregnované šablony se suší, následně jsou žhánuty za účelem odstranění šablony. Posledním krokem je slinování. Výsledkem je pozitivní replika původní šablony, struktura je ukázána na Obr. 15 [45].



Obr. 15 Struktura bioaktivního skla získaná replikační technikou [46].

b) Technika obětní šablony

Výsledkem je negativní replika obětovaného materiálu. Porézní keramika se získá smícháním vhodného množství obětního materiálu (látka tvořící budoucí póry) a keramické suspenze. Mezi nejčastější používané obětní fáze patří polymerní perličky, organická vlákna, bramborový škrob, kyselina salicylová a tekutý parafín. V průběhu slinování dojde k vypálení obětního materiálu a vytvoří se tak póry, viz Obr. 16 [45].

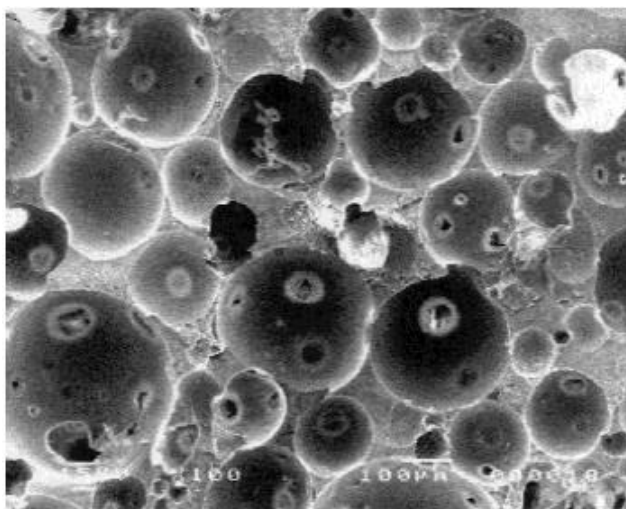


Obr. 16 Struktura β – TCP získaná technikou obětované šablony/materiálu [47].

c) Metoda přímého pění

Jednou z jednoduchých a nízkonákladových metod výroby porézního skafoldu je metoda přímého pění keramické suspenze. Jedná se o proces, při kterém jsou bublinky plynu začleněny do keramické suspenze. Jakmile suspenze ztuhne a vysuší se, keramika si zachová výsledné kulovité póry, viz Obr. 17 [35]. Tento postup umožňuje dosáhnout až 95 %-ní pórovitost. Nicméně v důsledku termodynamické nestability mohou plynové bubliny splývat a snižovat Gibbsovu volnou energii, což vede k příliš velkým pórům ve výsledné struktuře po slinutí. Z toho důvodu je zapotřebí bublinky plynu stabilizovat nejčastěji pomocí povrchově

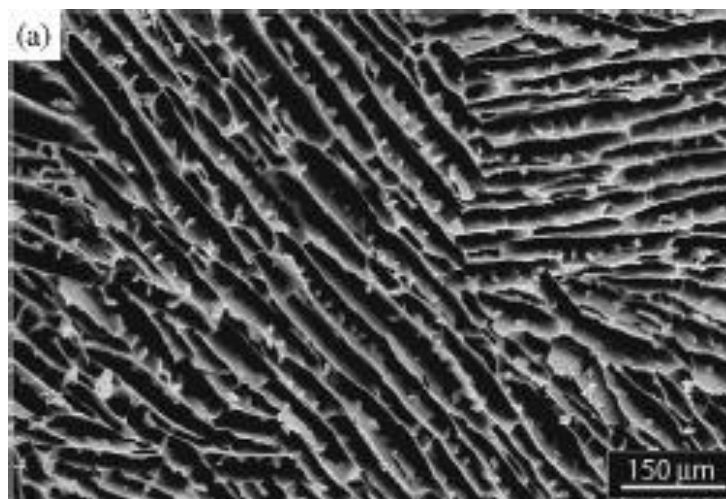
aktivní látky. Tyto látky snižují energii na rozhraní mezi plynem a suspenzí. Stabilizátory mohou být kationty, anionty nebo proteiny [45].



Obr. 17 Struktura bioaktivního skla získaná metodou přímého pění [48].

d) Odlévání se zmrazením (freeze casting)

Jedná se o výrobní proces mikroporézní keramiky s přijatelnou mechanickou stabilitou. Směs je složena z keramické a vodné suspenze. Při zmrazení dojde k přeměně vodné suspenze na ledové krystaly, které jsou uvězněny uvnitř keramické suspenze. Po následném odstranění krystalů vznikají v mřížce volné póry, viz Obr. 18. Bylo zjištěno, že reologické chování keramické suspenze ovlivňuje konečnou velikost pórů, pórovitost a pevnost v tlaku [49].



Obr. 18 Struktura hydroxyapatitu získaná metodou odlévání se zmrazením [50].

II. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 Příprava keramických pěn na bázi HA a SiO₂

Cílem experimentální části této práce bylo připravit makroporézní keramické skafoldy s uspokojivými biologickými vlastnosti a zlepšenými mechanickými vlastnostmi ve srovnání s běžně používanými skafoldy na bázi hydroxyapatitu.

5.1 Příprava

Byly připraveny a studovány materiály s chemickým složením tvořeným rozdílnými poměry hydroxyapatitu a SiO₂.

5.1.1 Materiály

Výchozími materiály použitými k přípravě byly: komerční prášek Hydroxyapatit (Fluka, Švýcarsko) o měrném povrchu 33,8 m²/g, dále koloidní roztok oxidu křemičitého Ludox SK-R (Grace, USA) - SiO₂ a deionizovaná voda (H₂O).

Stanovení hmotnostního obsahu SiO₂ v Ludoxu

Hmotnostní obsah SiO₂ byl stanoven pomocí gravimetrie a výpočtem z hustoty.

a) Gravimetricky

Koloidní roztok Ludox o počáteční hmotnosti $m_{poč.} = 16,704$ g byl po odpaření vody sušen po dobu 3 hod při teplotě 150 °C a následně zvážen ($m = 4,845$ g), poté byl tuhý zbytek vypálen při teplotě 950 °C po dobu 2 hod. a nakonec byl opět zvážen ($m_{kon.} = 4,456$ g). Výsledné hmotnostní zastoupení (w_{SiO_2}) bylo stanoveno dle následujícího vztahu:

$$w_{SiO_2} = \left(\frac{m_{kon.}}{m_{poč.}} \right) * 100 = \left(\frac{4,456}{16,704} \right) * 100 = 26,67 \text{ hm\%} \quad (5)$$

b) Výpočtem z hustoty

Byl odpipetován 1 ml SiO₂ a následně zvážen (průměrná hmotnost $m = 1,174$ g byla stanovena z 10 měření). Z tabulky, která je k dispozici na internetových stránkách výrobce (viz Obr. 19), bylo pomocí aproximace odečteno hmotností zastoupení $w_{SiO_2} = 26,6$ hm%.

% Binder Silica		% Binder Silica	
Specific Gravity	LUDOX® SK	Specific Gravity	LUDOX® SK
1.100	16.40	1.155	24.00
1.105	17.15	1.160	24.65
1.110	17.85	1.165	25.35
1.115	18.55	1.170	26.00
1.120	19.30	1.175	26.65
1.125	20.00	1.180	27.25
1.130	20.65	1.185	27.90
1.135	21.35	1.190	28.50
1.140	22.00	1.195	29.15
1.145	22.65	1.200	29.75
1.150	23.35	1.205	30.35

Obr. 19 Přepočtová tabulka, která udává hmotnostní obsah SiO₂ v závislosti na relativní hustotě koloidního roztoku [51].

Obě metody stanovení hmotnostního obsahu SiO₂ lze použít, získané hodnoty jsou si blízké. Pokles oproti teoretické hodnotě $w_{\text{SiO}_2} = 30 \text{ hm\%}$, udávané výrobcem, mohl být způsoben odpařením vody v důsledku dlouhodobého skladování. V dalších výpočtech se proto uvažovalo s obsahem $w_{\text{SiO}_2} = 26,67 \text{ hm\%}$.

5.1.2 Příprava suspenzí

Byly připraveny suspenze o čtyřech koncentracích, viz Tab. 1. V Tab. 1 je kromě navážek jednotlivých složek uvedeno i procentuální zastoupení SiO₂ vzhledem k HA, které bylo stanoveno pomocí přepočtu z kap. 5.1.1.

Princip přípravy byl u všech koncentrací stejný. Do naváženého roztoku SiO₂ (resp. SiO₂ + H₂O) byl za stálého míchání postupně přidáván prášek HA. Každá suspenze byla hodinu míchána pomocí elektrické vrtulové míchačky za konstantních otáček. Čtvrtá koncentrace musela být v průběhu míchání rozředěna z důvodu velké hustoty suspenze a nemožnosti jejího promíchání přidáním dalšího množství H₂O (suspenze se přilepovala na vrtulovou míchačku).

Tab. 1 Výchozí složení suspenzí

	HA [g]	Ludox [g]	SiO ₂ [g]	H ₂ O [g]	množství SiO ₂ po slinutí [hm%]
1. konc.	20	20	5,334	0	21,05
2. konc.	20	15	4	5	16,7
3. konc.	20	10	2,667	10	11,8
4. konc.	20	5	1,334	15+7 na rozředění	6,3

5.1.3 Příprava polymerních šablon

Z polymerních pěn Bulpren S, viz Tab. 2, (Eurofoam, ČR) byly připraveny vzorky o stejných rozměrech (průměr $d_0 = 9,4 \text{ mm}$ a výška $h_0 = 9 \text{ mm}$). Od každé pórovitosti bylo připraveno 16 vzorků. Následně bylo z pěny o pórovitosti 75 ppi připraveno 48 menších vzorků o průměru 4 mm a výšce 4,5 mm, které byly použity pro testování biologických vlastností *in vitro* v SBF.

Tab. 2 Použité polymerní pěny.

	Počet pórů na palec [ppi]	Průměr buněk (pórů) [μm]
Bulpren S 31048	90	440 – 520
Bulpren S 31062	75	520 – 720
Bulpren S 28089	60	740 – 1040

Hmotnosti připravených polymerních šablon:

60 ppi – 19 mg/kus, 75 ppi – 22 mg/kus, 90 ppi – 26 mg/kus

Připravené polymerní šablony byly zváženy, protože ve výsledcích bude analyzováno, zda po slinutí budou vzorky lehčí pouze o hmotnost polymerní šablony nebo zda bude úbytek hmotnosti větší.

5.1.4 Nanášení suspenze replikační technikou

Každá suspenze byla nanášena na 12 větších a 12 menších vzorků. Polymerní šablona byla pomocí pinzety ponořena do suspenze a následně vytažena. Přebytečná suspenze byla odstraněna stlačením vzorku mezi pomocnými polymerními pěnami. Poté byly vzorky sušeny na vzduchu při pokojové teplotě po dobu 24 hodin, viz Obr. 20. Jednotlivé suspenze se při nanášení nechovaly stejně. Již z nanášení vyplynulo, že suspenze o menším hmotnostním obsahu SiO_2 se nanáší lépe, jelikož koloidní SiO_2 působí jako tužidlo. Dalším důvodem nestejnoměrného chování mohly být rozdílné viskozity jednotlivých suspenzí (viskozitu ovlivňuje mimo jiné i zastoupení vody v suspenzi). Po zaschnutí byly vzorky zváženy.



Obr. 20 Vzorky 1. koncentrace po zaschnutí. Nahoře jsou vzorky o velikosti pórů 60 ppi, uprostřed vzorky 75 ppi, dole vzorky 90 ppi. Zvětšení – 1,2 krát.

5.1.5 Tepelné zpracování

Před slinováním v superkanthalové peci bylo nutné ze vzorků odstranit polymerní šablony. Vypálení šablon a předslinutí pěn proběhlo při teplotě $1000\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 2 hod. Teplotní přírůstek byl zvolen $1\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, aby v důsledku rychlého nárůstu teploty nedošlo k přílišné expanzi polymeru a následné destrukci makrostruktury. Slinování probíhalo při teplotě $1250\text{ }^\circ\text{C}$, teplotní přírůstek činil $5\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, následovala tříhodinová výdrž na této teplotě. Ochlazování probíhalo taktéž pozvolně, s krokem $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Ukázka části vzorků po slinutí je na Obr. 21. Následně byly vzorky opět změřeny (průměr $d_1 = 7,94\text{ mm}$ a výška $h_1 = 7,16\text{ mm}$, ve srovnání s neslinutými rozměry vzorků došlo ke smrštění, které je spočítáno dle vztahu (6) a (7).



Obr. 21 Vzorky 1. koncentrace po slinutí. Nahoře jsou vyobrazeny vzorky o velikosti pórů 60 ppi, uprostřed 75 ppi a dole 60 ppi. Zvětšení – 1,7 krát.

Smrštění:

$$\text{Průměru: } d = \left(1 - \frac{d_1}{d_0}\right) * 100 = \left(1 - \frac{7,94}{9,4}\right) * 100 = 15,53\% \quad (6)$$

$$\text{Délky: } l = \left(1 - \frac{h_1}{h_0}\right) * 100 = \left(1 - \frac{7,16}{9}\right) * 100 = 20,44\% \quad (7)$$

5.1.6 Příprava keramografických výbrusů

Vzorky byly zality za sníženého tlaku, pomocí přístroje Epovac (Struers, Dánsko), epoxidovou pryskyřici SpeciFix (Struers, Dánsko). Následně se vzorky zalité pryskyřicí nechal podle návodu 8 hodin vytvrdit, aniž by došlo ke smrštění. Poté byly vzorky broušeny na brusce Struers TegraForce-5, viz Obr. 22, nejdříve nesousledným broušením brusným kotoučem MD Piano 120 po dobu 140 minut, otáčkách 300 RPM a přítlačné síle 30 N. Následně se přešlo na sousledné broušení brusnou diamantovou suspenzí DiaPro 9 μm , na kotouči MD -Largo, doba broušení 21 minut, 150 RPM, přítlačná síla 30N. Následovalo leštění brusnou suspenzí DiaPro 3 μm , na kotouči MD -Dac po dobu 12 minut při otáčkách 150 RPM, přítlačné síle 15 N. Finálním krokem bylo doleštění brusnou suspenzí DiaPro 1 μm na kotouči MD -Dac, 7 minut, 150 RPM, přítlačná síla 15 N. Mezi každým krokem byly vzorky i bruska důkladně očištěny vodou. Snímky z výbrusu byly vyfotografovány pomocí digitální kamery AM4115ZT Dino – Lite Edge.



Obr. 22 Bruska Struers TegraForce-5 a ukázka výsledného keramografického výbrusu.

5.2 Výsledky

Cílem bylo vizuální vyhodnocení jednotlivých struktur nově připravených porézních keramických materiálů, spočtení porozity jednotlivých vzorků a nastínění biologických vlastností testem bioaktivity v SBF, respektive testem cytotoxicity.

5.2.1 Hmotnosti pěn

Pěny byly zváženy jak po zaschnutí suspenze, tak po slinutí a výsledné hmotnosti jsou uvedeny v následující tabulce, Tab. 3. Dále je v tabulce uveden průměrný úbytek hmotnosti po slinutí.

Tab. 3 Hmotnosti vzorků v závislosti na obsahu SiO₂ a velikosti pórů.

	ppi	Po zaschnutí [mg]				Průměr [mg]	Po slinutí [mg]				Průměr [mg]	Úbytek hmotnosti [mg]
21 hm% SiO₂	60	233	230	146	125	183±48	191	190	112	103	149±42	34
	75	252	246	203	223	231±19	216	202	166	181	191±19	40
	90	321	377	268	259	306±47	270	332	223	215	260±47	46
16,7 hm% SiO₂	60	151	211	188	129	169±32	121	178	153	97	137±31	32
	75	268	245	246	241	250±11	217	208	207	204	209±5	41
	90	315	351	316	353	333±18	273	307	272	310	290±18	43
10,8 hm% SiO₂	60	163	191	180	175	177±10	130	157	145	145	144±10	33
	75	274	276	320	330	300±25	231	238	273	286	257±23	43
	90	329	299	320	372	330±27	289	251	273	320	283±25	47
6,3 hm% SiO₂	60	69	79	66	88	75±9	39	48	39	60	46±9	29
	75	94	93	105	95	96±5	63	72	71	68	68±4	28
	90	164	152	160	161	159±4	116	117	123	117	118±3	41

Z výše uvedených hodnot vyplývá, že hmotnost skafoldů byla ovlivněna zejména velikostí makropórů. Čím více pórů na palec, tím byly jednotlivé vzorky těžší jak po zaschnutí, tak po slinutí. Vliv koncentrací 21 hm% SiO₂, 16,7 hm% SiO₂ a 10,8 hm% SiO₂ na hmotnosti jednotlivých vzorků je nepatrný. Koncentrace 6,3 hm% SiO₂ má zásadní vliv na hmotnost vzorků, jelikož připravená suspenze se velmi snadno nanášela na pěny, a tudíž nezalepila póry v takovém množství jako předchozí koncentrace.

Očekával jsem, že úbytek hmoty po slinutí se bude rovnat hmotnosti vypálené polymerní šablony, nicméně byl vyšší u všech koncentrací. Při slinutí došlo pravděpodobně navíc k odpaření fyzikálně vázané vody.

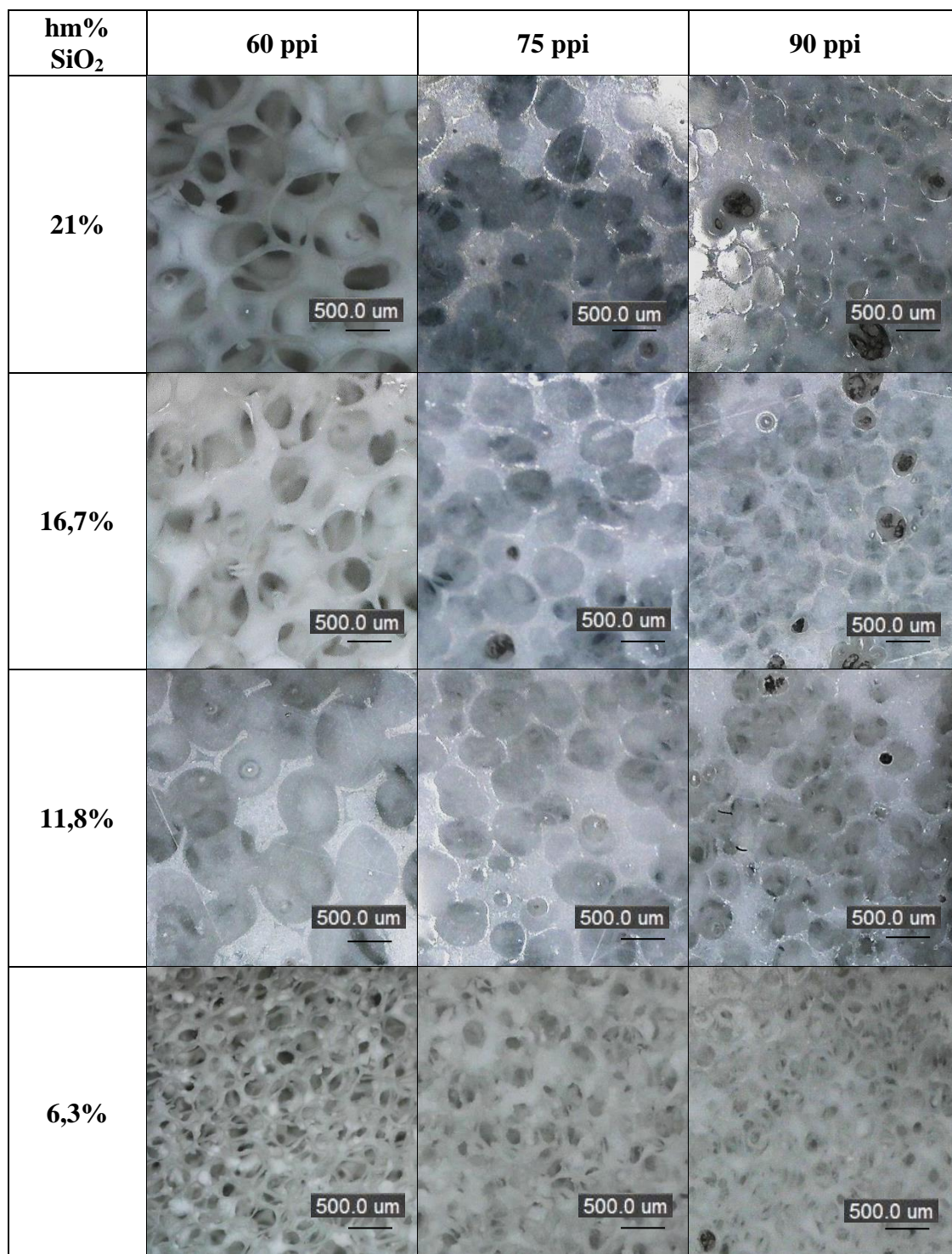
5.2.2 Vizualní zhodnocení mechanických vlastností

Pevnost vzorků jednotlivých koncentrací byla rozdílná, což šlo poznat už z manipulace s jednotlivými vzorky po slinutí. Jako nejpevnější se jevily vzorky s nejvyšším hmotnostním obsahem SiO₂ a nejvyšším počtem pórů na palec. S klesajícím zastoupením SiO₂ v dalších koncentracích klesala i pevnost jednotlivých vzorků a docházelo tak k vydrolování okrajových trámečků. Pevnost taktéž klesala v závislosti na počtu pórů na palec v následujícím pořadí: 90 ppi > 75 ppi > 60 ppi.

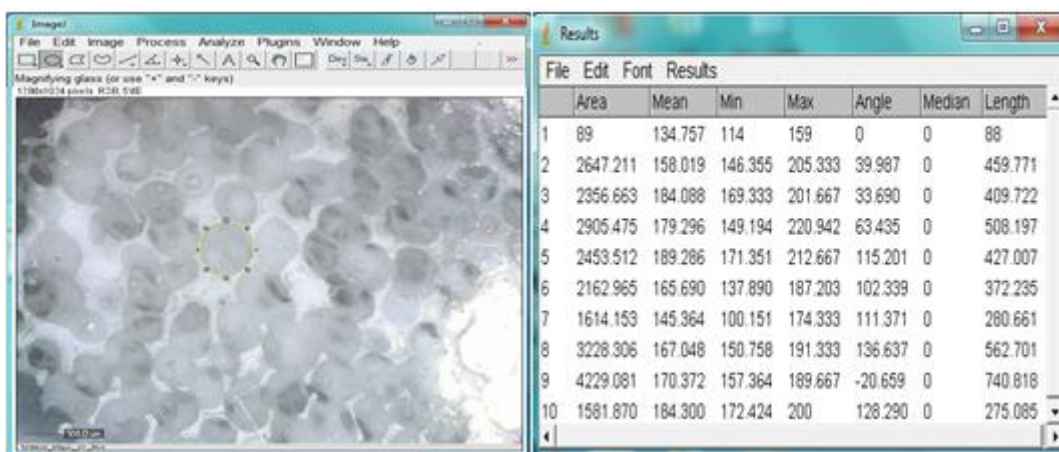
5.2.3 Vyhodnocení struktury

Hlavním cílem bylo vyhodnotit velikost pórů porézních struktur a nosné trámečky jednotlivých koncentrací. Následující tabulka, Tab. 4, ukazuje struktury pro všechny koncentrace a všechny porozity.

Tab. 4 Ukázky připravených porézních struktur v závislosti na velikosti pórů a obsahu SiO₂.



Již na první pohled je vidět, že velikosti pórů pro danou porozitu jsou si velmi podobné u všech koncentrací, nicméně velikost pórů byla vyhodnocena i prostřednictvím grafického softwaru ImageJ, viz Obr. 22. Takto získané průměrné velikosti pórů pro jednotlivé koncentrace a porozity jsou uvedeny v následující tabulce, Tab. 5.

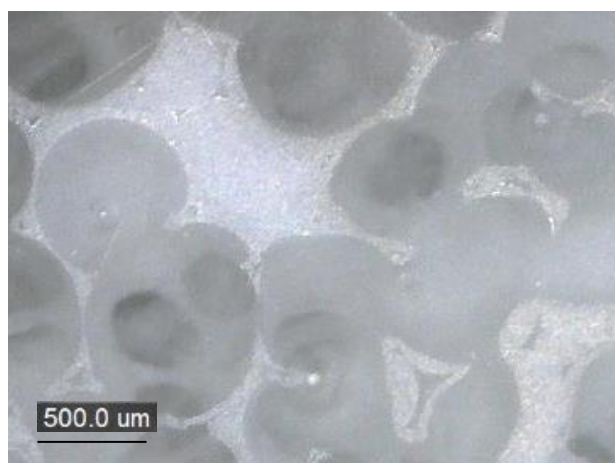


Obr. 22 Ukázka práce se softwarem ImageJ.

Tab. 5 Průměrné velikosti pórů stanovené prostřednictvím grafického softwaru ImageJ.

Změřený průměr pórů [μm]			
ppi	60	75	90
21 hm% SiO₂	636	479	381
16,7 hm% SiO₂	637	460	375
10,8 hm% SiO₂	639	476	366
6,3 hm% SiO₂	631	469	365

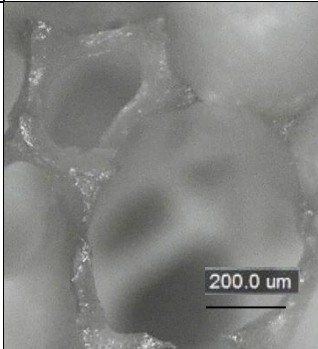
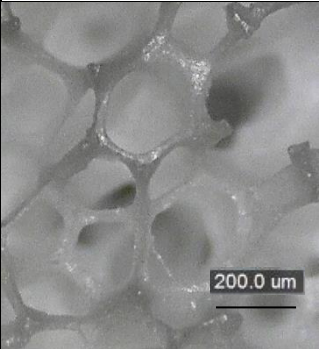
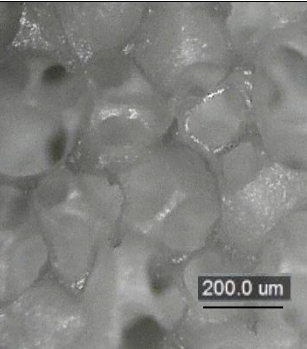
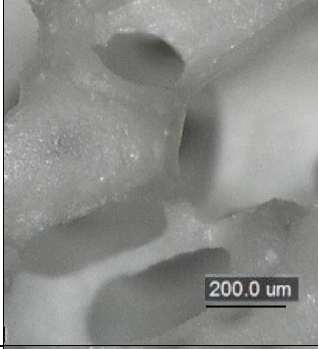
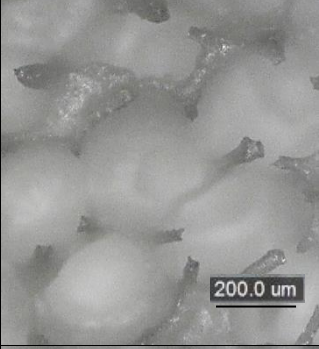
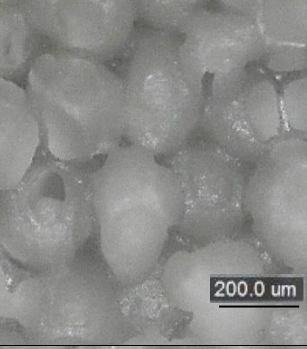
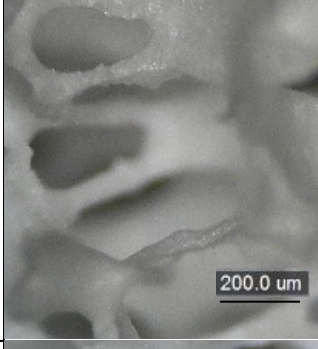
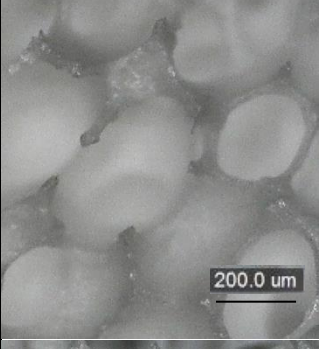
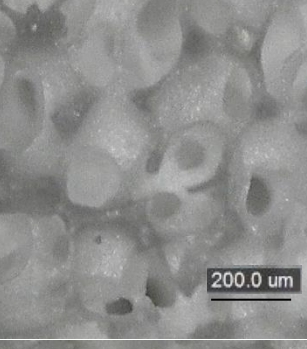
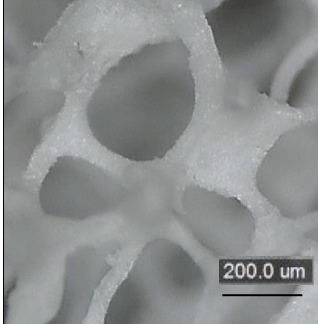
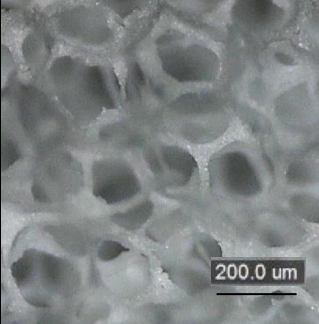
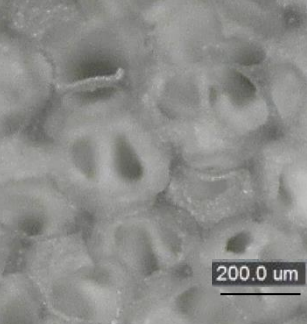
Po slinutí došlo k poklesu velikosti pórů oproti velikostem pórů v šabloně, které uvádí výrobce polymerních pěn Eurofoam. Z hlediska kostního tkáňového inženýrství, kde příznivá velikost pórů pro vrůstání kosti je maximálně do 400 μm (uváděno v kapitole 4.2.2), se pro přípravu skafoldů jako nejvhodnější jeví polymerní pěny Bulpren S 31048, průměrná velikost pórů před smršněním byla 480 μm, průměrná velikost pórů po slinutí byla 372 μm (velikost pórů je menší o nanesenou suspenzi na šablonu a o smršnění, které je spočítáno výše). Následující Obr. 23 ukazuje vzniklou dutinu uvnitř trámečku po vypálení polymerní pěny. Dutiny trámečků umožňují díky relativně malým velikostem ve srovnání s velikostí pórů vrůstání vazivové tkáně, zásobování živinami a dostatečné prokrvení. Tyto dutiny jsou navíc vzájemně propojené v důsledku vypálené polymerní šablony.



Obr. 23 Ukázka trojúhelníkové dutiny uvnitř trámečku, která vznikla po vypálení polymerní pěny.

Trojúhelníkový trámeček je relativně příznivý z hlediska struktury, kdy je požadováno co největší množství kulovitých pórů. Nicméně ostré rohy trojúhelníkových dutin uvnitř trámečků mohou působit jako koncentrátoři napětí. Optimálnější z hlediska napětí by byla kruhová dutina uvnitř trámečků. Tímto tvarem by ale nemohlo být při zachování stejné plochy průřezu trámečku dosaženo stejné porozity jako u trojúhelníkovitých tvarů. V následující Tab. 6 jsou zobrazeny trámečky všech koncentrací v závislosti na počtu pórů na palec.

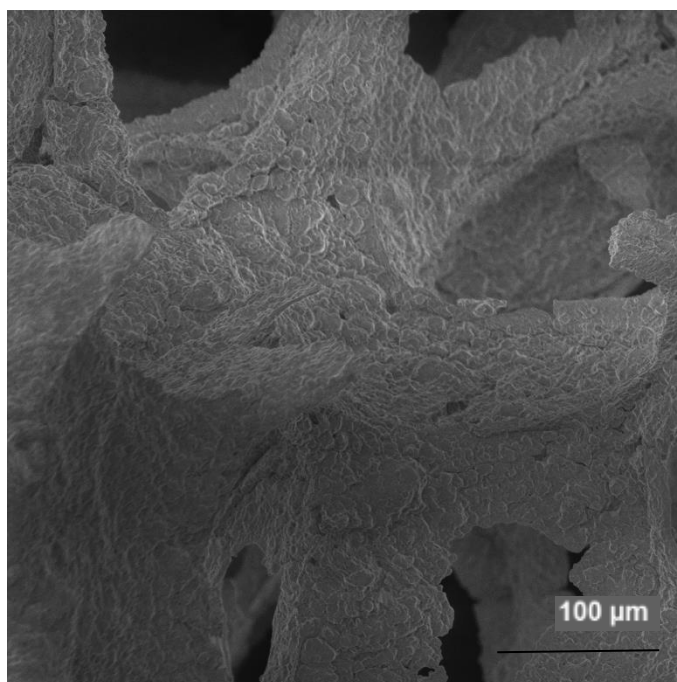
Tab. 6 Ukázka struktur s přihlédnutím k tloušťce jednotlivých trámečků.

hm% SiO ₂	60 ppi	75 ppi	90 ppi
21%			
16,7%			
11,8%			
6,3%			

Z Tab. 6 je zřejmé, že s rostoucím počtem pórů na palec klesají tloušťky trámečků u všech koncentrací. Tloušťka trámečků se u porozity 60 ppi pohybuje okolo 50 μm , u porozity 75 ppi okolo 40 μm a u porozity 90 ppi je tloušťka trámečků okolo 30 μm .

Mikrostruktura

Mikrostruktura byla zdokumentována prostřednictvím rastrovacího elektronového mikroskopu (LYRA, Tescan, Česká Republika). Ve strukturách jednotlivých koncentrací nebyly pozorovány téměř žádné rozdíly, viz Obr. 24.



Obr. 24 Mikrostruktura vzorku 6,3 hm% SiO₂, 75 ppi, s viditelnými zrny.

5.2.4 Stanovení objemové hmotnosti slinutých skafoldů

Pro určení porozity u jednotlivých koncentrací bylo nutné stanovit i jejich objemové hmotnosti. Nejprve bylo nutné stanovit objem slinutého vzorku ($V_{celk.}$):

$$V_{celk.} = \left(\frac{\pi \cdot d_1^2}{4} \right) \cdot h_1 = \left(\frac{\pi \cdot 7,94^2}{4} \right) \cdot 7,16 = 0,35 \text{ cm}^3 \quad (8)$$

kde d_1 je průměr vzorku v mm po slinutí a h_1 je výška vzorku v mm po slinutí, výsledné objemové hmotnosti viz Tab 7.

Objemová hmotnost byla stanovena dle následujícího vztahu:

$$\rho_{obj.} = \frac{m_{celk.}}{V_{celk.}} \quad (9)$$

kde $m_{celk.}$ je celková hmotnost vzorku po slinutí a $V_{celk.}$ je objem vzorku.

Tab. 7 Výsledné objemové hmotnosti (zdánlivé hustoty).

	ppi	vzorek 1 [mg/cm ³]	vzorek 2 [mg/cm ³]	vzorek 3 [mg/cm ³]	vzorek 4 [mg/cm ³]	průměr [mg/cm ³]
21 hm% SiO₂	60	538	536	316	291	420±117
	75	609	570	468	511	539±54
	90	762	937	629	606	733±131
16,7 hm% SiO₂	60	341	502	432	274	387±87
	75	612	587	584	575	589±13
	90	770	866	767	874	819±51
10,8 hm% SiO₂	60	367	443	409	409	407±27
	75	652	671	770	807	725±65
	90	815	708	770	902	799±71
6,3 hm% SiO₂	60	110	135	110	169	131±24
	75	178	203	200	192	193±10
	90	327	330	347	330	333±8

Výše uvedená tabulka potvrdila předpoklad, že s rostoucím počtem pórů na palec rostla i objemová hmotnost skafoldu. S rostoucím počtem pórů na palec klesala velikost pórů a zároveň rostl počet přítomných trámečků, tj. rostla plocha, která musela být obalena suspenzí.

5.2.5 Stanovení celkové porozity

Na základě rentgenové analýzy vzorku $w_{\text{SiO}_2} = 21 \text{ hm\% SiO}_2$ (slinutý vzorek byl rozdrcen v hmoždíři) bylo získáno fázové složení připraveného keramického materiálu a hmotnostní zastoupení fází. Hustoty jednotlivých fází byly dohledány v literatuře a na internetu. Hmotnostní zastoupení jednotlivých fází u zbývajících koncentrací bylo přepočítáno dle výsledků z rentgenové analýzy vzorku $w_{\text{SiO}_2} = 21 \text{ hm\% SiO}_2$, výsledné údaje jsou uvedeny v Tab. 8.

Přítomné fáze a jejich teoretické hustoty:

SiO₂: $\rho = 2330 \text{ mg/cm}^3$

α – TCP: $\rho = 2866 \text{ mg/cm}^3$

β – TCP: $\rho = 3066 \text{ mg/cm}^3$

Teoretická hustota kompozitního materiálu ($\rho_{\text{teor.}}$) je závislá na teoretických hustotách a hmotnostním zastoupení jednotlivých fází, a proto musela být vypočítána pro každou koncentraci zvlášť dle modifikovaného vztahu (9):

$$\rho_{\text{teor.}} = \frac{m_{\text{celk.}}}{V_{\text{celk.}}} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n \frac{\text{hm\%}_i}{\rho_i}} \quad (10)$$

kde hm\%_i je hmotnostní zastoupení i-té fáze a ρ_i je hustota i-té fáze. Výsledná hustota je taktéž uvedena v tabulce, Tab. 8.

Tab. 8 Zastoupení jednotlivých složek a celková hustota.

Předpokládané hm% SiO ₂	Skutečné hodnoty			
	SiO ₂ [hm%]	α – TCP [hm%]	β – TCP [hm%]	výsl. hustota [mg/ cm ³]
21	20,2	56,8	23	2780
16,7	16	59,8	24,2	2810
11,8	10,7	64	25,3	2830
6,3	5,3	67,4	27,3	2880

Nyní bylo možné stanovit porozitu jednotlivých vzorků dle vztahu (1), uvedeného v teoretické části této práce. Hodnoty jsou uvedeny v následující tabulce, Tab. 9.

Tab. 9 Výsledné porozity všech vzorků.

	ppi	Porozita vzorek 1 [%]	Porozita vzorek 2 [%]	Porozita vzorek 3 [%]	Porozita vzorek 4 [%]	Rozmezí porozit [%]
21 hm% SiO ₂	60	81	81	89	90	81-90
	75	78	80	83	82	78-83
	90	73	66	77	78	66-78
16,7 hm% SiO ₂	60	88	82	85	90	82-90
	75	78	79	79	79	78-79
	90	73	69	73	69	69-73
10,8 hm% SiO ₂	60	87	84	86	86	84-87
	75	77	76	73	71	71-77
	90	71	75	72	68	68-75
6,3 hm% SiO ₂	60	96	95	96	94	94-96
	75	94	93	93	93	93-94
	90	89	89	88	88	88-89

Z uvedené tabulky vyplývá, že s rostoucím počtem pórů na palec klesala celková porozita u všech koncentrací, což potvrdilo předpokládané chování. Porozity koncentrací 21 hm% SiO₂, 16,7 hm% SiO₂ a 10,8 hm% SiO₂ jsou si velmi podobné. U koncentrace 6,3 hm% SiO₂ se muselo do suspenze v průběhu míchání přidat 7g H₂O na rozředění. Přidaná voda pravděpodobně snížila viskozitu suspenze, a proto se suspenze výrazně lépe nanášela na vzorky, tudíž bylo ve vzorku více prázdného prostoru, což vedlo k vyšší porozitě a výrazně nižší pevnosti.

Srovnáme-li porozitu trámčité (spongiózní) kosti s porozitami jednotlivých vzorků, dojdeme k závěru, že nejlépe odpovídají vzorky o porozitě 90 ppi.

5.2.6 Test v simulované tělní tekutině (SBF)

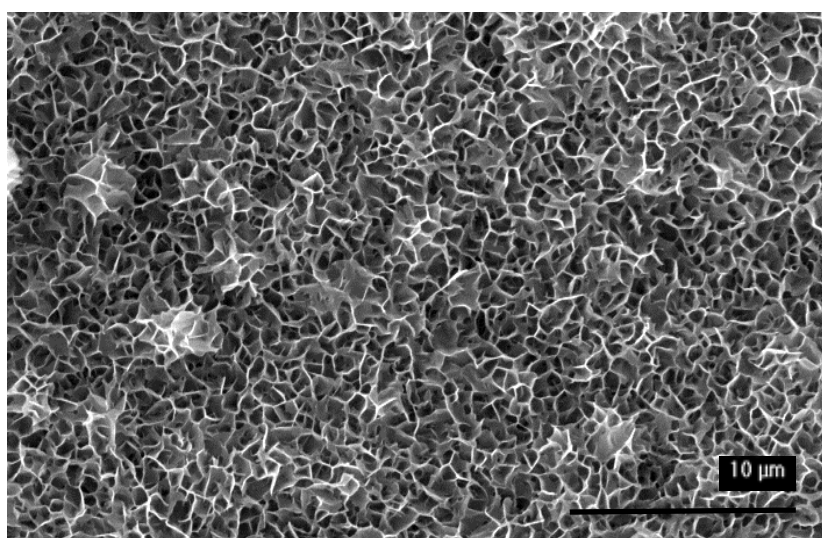
Cílem tohoto testu bylo zjistit, zda vzorky o daných koncentracích vykazují bioaktivní chování, tj. dojde-li k vytvoření apatitové vrstvy na povrchu vzorku. Vzorky byly ponechány v tekutině SBF po různě dlouhé doby – 7, 14, 28 dní, teplota v inkubátoru 36,5 °C, viz Obr. 25.

Ani po 28 dnech působení tělní tekutiny nebyla na vzorku pozorována jakákoliv změna povrchové struktury. Nedošlo k nárůstu nově vzniklé apatitové vrstvy. Tento výsledek by mohl napovídat, že vzorky nebyly bioaktivní. Nicméně výsledná struktura byla tvořena trikalciumpfosfáty, které jsou všeobecně považovány za bioaktivní, a SiO₂, který je složkou bioak-

tivního skla. Z toho vyplývá, že povrch vzorku se měl dle předpokladu chovat bioaktivně. Je tedy možné a pravděpodobné, že simulovaná tělní tekutina nebyla správně připravena. Pravděpodobně nebylo dodrženo požadované $\text{pH} = 7,4$ a nedošlo tak k tvorbě apatitu na povrchu. Z toho důvodu bude nutné v budoucnosti tento test zopakovat. Vzorky byly dále testovány na cytotoxicitu. Byly ponechány v přítomnosti kultivačního media, obsahujícím stejné iontové složení jako SBF. Již po třídenním testu se povrchová struktura výrazně lišila. Povrch vzorku se 6,3 hm% SiO_2 byl zcela a rovnoměrně pokryt nově vzniklou vrstvou apatitu, viz Obr. 26. Na vzorku s 10 hm% SiO_2 začínaly být teprve patrné oblasti nově vznikajícího apatitu. Na vzorcích s nejvyššími obsahy SiO_2 nebyla po třech dnech testu patrna žádná změna. Lze tedy předběžně konstatovat, že vzorek s nejnižším obsahem SiO_2 se chová biologicky nejaktivněji a vrůstání tkáně by tedy mohlo probíhat nejrychleji.



Obr. 25 Inkubátor, kde probíhal test SBF.



Obr. 26 Struktura s nejmenším hmotnostním obsahem SiO_2 zcela pokrytá apatitovou vrstvou.

Závěr

Teoretická část bakalářské práce popisuje současně používané biomateriály v kostním tkáňovém inženýrství zejména pro ortopedické a dentální účely, vymezuje hlavní požadavky na ně kladené. Taktéž poukazuje na nové trendy používání keramických materiálů v orbitální chirurgii. Keramické materiály se dají rozdělit na hutné a porézní, zvláštní skupinu tvoří kompozity. Kompozity nachází rozsáhlé uplatnění díky kombinaci rozdílných vlastností jednotlivých složek a jejich možné optimalizace. V další části práce byla popsána hutná keramika na bázi Al_2O_3 a fázově zhouževnatělem ZrO_2 . Používá se zejména k výrobě částí totálních endoprotéz a na celokeramické náhrady zubů. Mezi nejčastější způsoby výroby patří izostatické lisování za studena/tepla, injekční vstřikování, suspenzní lití a CAD/CAM modelování a obrábění. Oproti tomu bioaktivní porézní materiály umožňují vrůstání tkáně, stejně tak jako vaskularizaci. Současnými výzvami je výroba propojených pórů, trojrozměrná struktura, nezbytnou funkcí je přeprava živin a kyslíku. Tato kritéria splňují například skafoldy z kalciumfosfátů nebo bioaktivního skla a sklokeramiky. Porézní struktura se dá připravit například pomocí replikační techniky, techniky obětní šablony, přímého pění, méně používané je odlévání se zmrazením.

Experimentální část práce byla věnována přípravě nového bioaktivního porézního keramického materiálu na bázi HA s přídavkem SiO_2 se zlepšenými vlastnostmi ve srovnání s čistým HA. Replikační technikou, tj. technikou, která nejlépe napodobuje strukturu spongiózní kosti, byly připraveny 4 sady vzorků o rozdílném poměru HA/ SiO_2 . Z výše získaných výsledků vyplynulo, že nejvhodnější byly materiály o velikosti pórů přibližně $370\ \mu\text{m}$ (odpovídá výchozí šabloně 90 ppi). Tato porozita a velikost pórů byla srovnatelná se spongiózní kostí. Z hlediska bioaktivity se nejpříznivěji jevily materiály o nejnižších koncentracích SiO_2 . Z vizuálního posouzení mechanických vlastností a s ohledem na bioaktivitu, materiál o koncentraci 10,8 hm% SiO_2 dosahoval nejlepších výsledků. Tento materiál by měl být i nadále zkoumán jako jeden z možných materiálů, který by mohl díky svým vlastnostem najít uplatnění v kostním tkáňovém inženýrství. Součástí dalšího výzkumu by mělo být provedení mechanických testů, zopakování *in vitro* testu v SBF a *in vitro* buněčných testů. Následně by se měly provést *in vivo* testy na zvířatech a na závěr zhodnotit výsledky a rozhodnout, zda je daný materiál vhodný k přípravě skafoldů, resp. k následnému použití v klinických aplikacích.

Seznam použitých zdrojů

- [1] RATNER, B.D., et al. *Biomaterials science: a multidisciplinary endeavor*. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. 2004, vol. 2, pp. 1-20.
- [2] KOČICOVÁ, P. *Syntéza biokeramických materiálů na bázi hydroxyapatitu*. Brno: Vysoké učení technické v Brně 2013. Diplomová práce, VUT, Fakulta strojního inženýrství.
- [3] JENABZADEH, A.-R., S.J. PEARCE, and W.L. WALTER, Total Hip Replacement: Ceramic-on-Ceramic. *Seminars in Arthroplasty*. 2012, vol. 23, issue 4, pp. 232- 240, ISSN 1045-4527.
- [4] BOSE, Susmita, Mangal ROY a Amit BANDYOPADHYAY. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. 2012, vol. 30, issue 10, pp. 546-554, ISSN 0167-7799.
- [5] EUROMISE. *Centrum Univerzity Karlovy a Akademie věd České republiky* [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z WWW: < <http://ucebnice.euromise.cz/index.php?conn=0§ion=biomech&node=node106> >.
- [6] HENCH, Larry L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*. 1998, vol. 19, issue 16, pp. 1419-1423, ISSN 0142-9612.
- [7] HENESS, Greg a Besim BEN-NISSAN. Innovative bioceramics. *Institute of Materials Engineering Australasia Ltd*. 2004, vol. 27, pp. 104-114.
- [8] BIOSTABILITA, Velký lékařský slovník [online]. 2008 [cit. 2015-04-15]. Dostupné z WWW: < <http://lekarske.slovniky.cz/pojem/biostabilita> >.
- [9] DAVIS, J. Chapter 1, Overview of biomaterials and their use in medical devices. *Handbook of Materials for Medical Devices*, Materials Park, OH: ASM International. 2003, viii, pp. 1-11. ISBN 08-717-0790-X.
- [10] FERGAL J. O'BRIEN. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. 2011, vol. 14, issue 3, pp. 88-95, ISSN 1369-7021..
- [11] LOGEART-AVRAMOGLU, D., F. ANAGNOSTOU, R. BIZIOS a H. PETITE. Engineering bone: challenges and obstacles. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005, vol. 9, issue 1, pp. 72-84.
- [12] KARAGEORGIU, V a D KAPLAN. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005, vol. 26, issue 27, pp. 5474-5491, ISSN 0142-9612.
- [13] GUNATILLAKE, P.A. a R. ADHIKARI. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. *Eur Cell Mater*. 2003, vol. 5, pp. 1-16, ISSN 1473-2262.
- [14] ZHOU, Huan, Joseph G. LAWRENCE a Sarit B. BHADURI. Fabrication aspects of PLA-CaP/PLGA-CaP composites for orthopedic applications: A review. *Acta Biomaterialia*. 2012, vol. 8, issue 6, pp. 1999-2016, ISSN 1742-7061.

- [15] VAN de VELDE, K. a P. KIEKENS. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*. 2002, vol. 21, issue 4, pp. 433-442, ISSN 0142-9418.
- [16] HENCH, Larry L., Giuseppe CAMA, Steven A. GOLDSTEIN a Leonard A. VALENTINO. Bioceramics: From Concept to Clinic. *Journal of the American Ceramic Society*. 1991, vol. 74, issue 7, pp. 1487-1510.
- [17] BAINO, Francesco a Chiara VITALE-BROVARONE. Ceramics for oculo-orbital surgery. *Ceramics International*. 2015, vol. 41, issue 4, pp. 5213-5231.
- [18] GASSER, B. About composite materials and their use in bone surgery. *Injury*. 2000, vol. 31, pp. D48-D53, ISSN 0020-1383.
- [19] MOHSENI, E., E. ZALNEZHAD a A.R. BUSHROA. Comparative investigation on the adhesion of hydroxyapatite coating on Ti-6Al-4V implant: A review paper. *International Journal of Adhesion and Adhesives*. 2014, vol. 48, pp. 238-257.
- [20] KIM, Hae-Won, Seung-Yong LEE, Chang-Jun BAE, Yoon-Jung NOH, Hyoun-Ee KIM, Hyun-Man KIM a Jea Seung KO. Porous ZrO₂ bone scaffold coated with hydroxyapatite with fluorapatite intermediate layer. *Biomaterials*. 2003, vol. 24, issue 19, pp. 3277-3284, ISSN 0142-9612.
- [21] AN, Sang-Hyun, Takuya MATSUMOTO, Hiroyuki MIYAJIMA, Atsushi NAKAHIRA, Kyo-Han KIM, Satoshi IMAZATO, Wenyong ZHOU, Milan PETROVIC, Wen YOU, Min WANG, Wai LAM a Wing YUK. Porous zirconia/hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction. *Dental Materials*. 2012, vol. 28, issue 12, pp. 1221-1231, ISSN 0109-5641.
- [22] CHEVALIER, J. a L. GREMILLARD. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*. 2009, vol. 29, issue 7, pp. 1245-1255, ISSN 0955-2219.
- [23] PICONI C. , MACCAURO G., MURATORI F. a E.M. Brach del PREVER. Alumina and zirconia ceramics in joint replacements. *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*. 2003, vol. 1, pp. 19-32.
- [24] KURTZ, Steven M., Sevi KOCAGÖZ, Christina ARNHOLT, Roland HUET, Masaru UENO, William L. WALTER, Shalaby SHALABY, Shawn PENISTON a Sheila NAGATOMI. Advances in zirconia toughened alumina biomaterials for total joint replacement. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2014, vol. 31, p. 107-116, ISSN 1751-6161.
- [25] PICONI, C., G. MACCAURO. Zirconia as a ceramic biomaterial. *Biomaterials*. 1999, vol. 20, issue 1, pp. 1-25, ISSN 0142-9612.
- [26] HANNINK, Richard H. J., Patrick M. KELLY a Barry C. MUDDLE. Transformation Toughening in Zirconia-Containing Ceramics. *Journal of the American Ceramic Society*. 2000, vol. 83, issue 3, pp. 461-487.

- [27] RITZBERGER, C., et al.. Properties and Clinical Application of Three Types of Dental Glass-Ceramics and Ceramics for CAD-CAM Technologies. *Materials*. 2010, vol. 3, issue 6, pp. 3700-3713.
- [28] DENRY, I a J KELLY. State of the art of zirconia for dental applications. *Dental Materials*. 2008, vol. 24, issue 3, pp. 299-307, ISSN 0109-5641.
- [29] DENTAL ARABIA. *Dental implants*. [online]. [cit. 2015-04-13]. Dostupné z WWW: < <http://www.dentalarabia.me/page/ceramic-implants> >.
- [30] REPLACEMENT CERAMIC HIP JOINTS. *UKessays*. [online]. [cit. 2015-05-13]. Dostupné z WWW: < <http://www.ukessays.com/essays/sciences/replacement-ceramic-hip-joints.php> >.
- [31] ANI, Sarizal Md, Andanastuti MUCHTAR, Norhamidi MUHAMAD a Jaharah A. GHANI. Fabrication of zirconia-toughened alumina parts by powder injection molding process: Optimized processing parameters. *Ceramics International*. 2014, vol. 40, issue 1, pp. 273-280.
- [32] HASSANIN, H. a K. Jiang, Fabrication and characterization of stabilised zirconia micro parts via slip casting and soft moulding. *Scripta Materialia*. 2013, vol 69, issue 6, pp. 433-436, ISSN 1359-6462.
- [33] YIN, Ling, X.F. SONG, Y.L. SONG, T. HUANG a J. LI. An overview of in vitro abrasive finishing & CAD/CAM of bioceramics in restorative dentistry. *International Journal of Machine Tools and Manufacture*. 2006, vol. 46, issue 9, pp. 1013-1026.
- [34] CAD/CAM PROTETIKA. *Elitedent*. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z WWW: < <http://www.elite-dent.com/en/cad-cam-prosthetics-in-the-elitedent/11> >.
- [35] HAMMEL, E.C., O.L.-R. IGHODARO a O.I. OKOLI. Processing and properties of advanced porous ceramics: An application based review. *Ceramics International*. 2014, vol. 40, issue 10, část A, pp. 15351-15370, ISSN 0272-8842.
- [36] HANNINK, G. and J.J. ARTS. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? *Injury*. 2011, vol. 42, issue 2, pp. S22-S25.
- [37] LIU, D.-M.. Influence of porosity and pore size on the compressive strength of porous hydroxyapatite ceramic. *Ceramics International*. 1997, vol. 23, issue 2, pp. 135-139, ISSN 0272-8842.
- [38] THE MARSHALL PROTOCOL KNOWLEDGE BASE. *Autoimmunity Research Foundation*. [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z WWW: < http://mpkb.org/home/patients/assessing_literature/in_vitro_studies >.
- [39] KUNJALUKKAL PADMANABHAN, S., et al.. Wollastonite/hydroxyapatite scaffolds with improved mechanical, bioactive and biodegradable properties for bone tissue engineering. *Ceramics International*. 2013, vol. 39, issue 1, pp. 619-627, ISSN 0272-8842.

- [40] WANG, Qianbin et al.. Degradation kinetics of calcium polyphosphate bioceramic: an experimental and theoretical study. *Mat. Res.* 2009, vol. 12, issue 4, pp. 495-501.
- [41] REZWAN, K., Q.Z. CHEN, J.J. BLAKER, Aldo Roberto BOCCACCINI, S.K. MISRA a A.R. BOCCACCINI. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006, vol. 27, issue 18, pp. 3413-3431, ISSN 0142-9612.
- [42] SAMAVEDI, Satyavrata, Abby R. WHITTINGTON, Aaron S. GOLDSTEIN, Paul SPAUWEN, John JANSEN, P QUINTENRUHÉ, Joop WOLKE, Susmita BOSE, Solaiman TARAFDER, Shashwat BANERJEE a Amit BANDYOPADHYAY. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: A review of properties and their influence on cell behavior. *Acta Biomaterialia.* 2013, vol. 9, issue 9, pp. 8037-8045, ISSN 1742-7061.
- [43] CAO, W. and L.L. HENCH, Bioactive materials. *Ceramics International.* 1996, vol. 22, issue 6, pp. 493-507, ISSN 0272-8842.
- [44] MAYR, Hermann O., Norbert P. SUEDEKAMP, Thorsten HAMMER, Werner HEIN, Robert HUBE, Philipp V. ROTH a Anke BERNSTEIN. β -Tricalcium phosphate for bone replacement: Stability and integration in sheep. *Journal of Biomechanics.* 2015, vol. 48, issue 6, pp. 1023-1031, ISSN 0021-9290.
- [45] STUDART, A. R., GONZENBACH, U. T., TERVOORT, E. a GAUCKLER, L. J.. Processing Routes to Macroporous Ceramics: A Review. *Journal of the American Ceramic Society.* 2006, vol. 89, issue 6, pp. 1771–1789.
- [46] ŘEHOŘEK, L., et al.. Response of 45S5 Bioglass® foams to tensile loading. *Ceramics International.* 2013, vol. 39, issue 7, pp. 8015-8020.
- [47] DESCAMPS, M., et al.. Synthesis of macroporous β -tricalcium phosphate with controlled porous architectural. *Ceramics International.* 2008, vol. 34, issue 5, pp. 1131-1137.
- [48] SEPULVEDA, P., JONES, J. R. and HENCH, L. L.. Bioactive sol-gel foams for tissue repair. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, vol. 59, pp. 340–348..
- [49] MAAS, Michael, Ulrike HESS, Kurosch REZWAN a Nenad IGNJATOVIC. The contribution of rheology for designing hydroxyapatite biomaterials. *Current Opinion in Colloid & Interface Science.* 2014, vol. 19, issue 6, pp. 585-593.
- [50] DEVILLE, S., E. SAIZ, and A.P. TOMSIA. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006, vol. 27, issue 32, pp. 5480-5489.
- [51] LUDOX SK-R. *Grace.* [online]. [cit. 2015-04-15]. Dostupné z WWW: < https://grace.com/general-industrial/en-us/Documents/ludox_SK_investment_casting_E_08_081110.pdf >.